

# **Hiperlipidémia okozta neurodegeneratív és vér-agy gát-elváltozások ApoB-100 transzgenikus egerekben**

Doktori (Ph. D.) értekezés

**Lénárt Nikolett**

**Témavezető: Dr. Sántha Miklós**

tudományos főmunkatárs

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémia Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

2014

Szeged

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK JEGYZÉKE .....	- 1 -
1. BEVEZETÉS/IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	- 1 -
1.1. A PLAZMALIPIDEK TRANSZPORTJA .....	- 1 -
1.2. A LIPOPROTEINEK FELÉPÍTÉSE, SZERKEZETE .....	- 1 -
1.3. AZ APOLIPOPROTEIN B (APOB) ÉLETTANI SZEREPE.....	- 1 -
1.4. AZ APOB-HEZ KÖTŐDŐ RENDELLENSÉGEK .....	- 2 -
1.5. LIPOPROTEINEK A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN .....	- 4 -
1.6. A KÖZPONTI IDEGRENSZER KOLESZTERIN-HOMEOSZTÁZISA .....	- 6 -
1.7. NEURODEGENERÁCIÓ .....	- 7 -
1.8. A HIPERLIPIDÉMIA ÉS A NEURODEGENERÁCIÓ KAPCSOLATA .....	- 13 -
1.9. A CEREBROVASKULÁRIS RENDSZER ÉS A VÉR-AGY GÁT FELÉPÍTÉSE.....	- 16 -
1.10. A VÉR-AGY GÁT CELLULÁRIS KAPCSOLATAI .....	- 17 -
1.11. A VÉR-AGY GÁT KÁROSODÁSA.....	- 18 -
1.12. A CEREBROVASKULÁRIS RENDSZER HIPOPERFÚZIÓ ÉS HIPOXIA HATÁSÁRA BEKÖVETKEZŐ PATOLÓGIÁS ELVÁLTOZÁSAI .....	- 19 -
2. CÉLKITŰZÉS.....	- 22 -
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	- 24 -
3.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK .....	- 24 -
3.2. A GENOMI DNS IZOLÁLÁSA.....	- 25 -
3.3. GENOTÍPIZÁLÁS PCR-VAL .....	- 26 -
3.4. SZÉRUMTRIGLICERID-SZINT MEGHATÁROZÁS.....	- 26 -
3.5. NÍLUS VÖRÖS FESTÉS .....	- 27 -
3.6. FILIPIN FESTÉS .....	- 27 -
3.7. IMMUNHISZTOKÉMIA.....	- 28 -
3.8. ALKALIKUS KONGÓ VÖRÖS FESTÉS .....	- 28 -
3.9. WESTERN BLOT .....	- 29 -
3.10. KVANTITATÍV WESTERN BLOT .....	- 30 -
3.11. GOLGI-COX EZÜSTIMPREGNÁCIÓ.....	- 30 -
3.12. FLUORO-JADE C FESTÉS.....	- 31 -
3.13. ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK ELŐKÉSZÍTÉSE .....	- 31 -
3.14. INGERLÉSI PROTOKOLL.....	- 32 -
3.15. LTP ÉS DEPOTENCIROZÁSI PROTOKOLL.....	- 32 -
3.16. <i>IN VIVO</i> VÉR-AGY GÁT FUNKCIÓ VIZSGÁLAT .....	- 33 -
3.17. KORTIKÁLIS MIKROEREK IZOLÁLÁSA .....	- 34 -
3.18. RNS IZOLÁLÁS MIKROÉR FRAKCIÓBÓL.....	- 34 -
3.19. REVERZ TRANSZKRIPCIÓ ÉS QPCR .....	- 34 -
3.20. PRIMER KAPILLÁRIS ENDOTHELSEJTEK/PERICYTÁK IZOLÁLÁSA.....	- 35 -
3.21. PRIMER ASTROCYTÁK IZOLÁLÁSA .....	- 36 -
3.22. IMMUNCITOKÉMIA PRIMER ENDOTHELSEJTEKEN, ASTROCYTÁKON ÉS PERICYTÁKON.....	- 36 -
3.23. <i>IN VITRO</i> VIABILITÁSI/TOXICITÁSI TESZTEK PRIMER SEJTEKEN .....	- 37 -
3.24. VALÓS IDEJŰ VIABILITÁS VIZSGÁLAT (XCELLIGENCE RENDSZERREL) .....	- 38 -
3.25. <i>IN VITRO</i> TOXICITÁS VIZSGÁLAT/LDH TESZT .....	- 38 -
3.26. <i>IN VITRO</i> ROS MÉRÉS PRIMER SEJTEKEN.....	- 39 -
4. EREDMÉNYEK .....	- 40 -

4.1. A HUMÁN <i>APOB</i> TRANSZGENIKUS EGEREK GENOTIPIZÁLÁSA.....	- 40 -
4.2. SZÉRUMTRIGLICERID-MÉRÉS.....	- 40 -
4.3. AGYI LIPIDMETABOLIZMUS .....	- 41 -
4.4. LIPOPROTEIN-, ÉS AMILOIDMETABOLIZMUS .....	- 42 -
4.5. A TAU-FEHÉRJE HIPERFOSZFORILÁCIÓJA.....	- 45 -
4.6. NEURONÁLIS APOPTÓZIS, NEURODEGENERÁCIÓ .....	- 49 -
4.7. ELEKTROFIZIOLÓGIA.....	- 52 -
4.8. IN VIVO VÉR-AGY GÁT FUNKCIÓ VIZSGÁLAT .....	- 54 -
4.9. KORTIKÁLIS MIKROÉR FRAKCIÓ GÉNEXPRESSZIÓS VIZSGÁLATA QRT-PCR-VAL.....	- 56 -
4.10. IMMUNCITOKÉMIA PRIMER ENDOTHELSEJTEKEN, ASTROCYTÁKON ÉS PERICYTÁKON.....	- 58 -
4.11. PRIMER SEJTEK NÖVEKEDÉSI KINETIKÁJA.....	- 61 -
4.12. VALÓS IDEJŰ VIABILITÁS ÉS TOXICITÁS (LDH) VIZSGÁLATOK PRIMER SEJTEKEN .....	- 61 -
4.13. IN VITRO ROS MÉRÉS PRIMER SEJTEKEN .....	- 64 -
5. DISZKUSSZIÓ .....	- 67 -
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	- 76 -
IRODALOMJEGYZÉK.....	- 77 -
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK.....	- 86 -
ÖSSZEFOGLALÓ .....	- 87 -
SUMMARY .....	- 90 -
FÜGGELÉK.....	93

## Rövidítések és jelölések jegyzéke

7 $\beta$ OHC	7 $\beta$ -hidroxi-koleszterin
7ketoC	7-ketokoleszterin
24OHC	24-hidroxi-koleszterin
27OHC	27-hidroxi-koleszterin
$\alpha$ -SM	$\alpha$ -simaizom aktin
ABC transzporter	ATP-kötő kazetta transzporter (ATP-binding cassette transporter)
ABCA1 (CERP)	koleszterin efflux szabályozó fehérje
ABCB1B (P-gp)	multidrog rezisztencia fehérje-1/P-gp
ABCG1	ATP-kötő kazetta transzporterek G alcsaládjának 1-es tagja
AD	Alzheimer-kór
AIF	apoptózis indukáló faktor
AJ	szoros kapcsolat/zonula adherens (adherens junction)
ANG1, 2	angiopoetin-1,-2
ApoA, -I,-II,-IV	apolipoprotein A, -I, -II, -IV
ApoB, -48, -100	apolipoprotein B, -48, -100
<i>APOB</i>	a humán apolipoprotein B-t kódoló gén
ApoC, 1	apolipoprotein C, 1
ApoD, E, H, J	apolipoprotein D, E, H, J (clusterin)
APP	amiloid prekursor fehérje
AQP4	akvaporin 4
A $\beta$ <sub>1-40/1-42</sub>	40, ill. 42 aminosav hosszú $\beta$ -amiloid/amiloid-béta peptid
$\beta$ -cat.	$\beta$ -katenin
BAEC	szarvasmarha aorta endothelsejt (bovine aortic endothelial cells)
Bulb. olf.	szaglógumó (Bulbus olfactorius)
CAMK2	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-függő fehérje kináz
Cat	kataláz
Cav-1	kaveolin-1
Cdc2	ciklin-függő fehérje kináz 2
Cdk5	ciklin-függő fehérje kináz 5
CETP	koleszterin-észter transzfer fehérje
ChREBP	szénhidrátszabályozó-elem kötő fehérje

CI	sejtindex
Cldn-5	klaudin-5
CNT2	koncentratív nukleozid transzporter 2
Cortex cer.	agykéreg (Cortex cerebri)
CRP2	cisztein-gazdag fehérje 2
CYP7A1	koleszterin 7- $\alpha$ -hidroxiláz
CytC	citokróm c
EAAT1, 2, 3	serkentő aminosav transzporter 1, 2, 3
EB	Evans-kék
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintetáz
FAD	familiális Alzheimer-kór
FAS	zsírsav szintetáz
fEPSP	serkentő posztzinaptikus mezőpotenciál
GJ	réskapcsolat/macula communicans (gap junction)
Glut1	glükóz transzporter 1
GSH	glutation
GSK3- $\beta$	glikogén szintetáz kináz-3- $\beta$
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein
HFS	magas frekvenciás ingerlés
HIF-1 $\alpha$	hipoxia-indukáló faktor 1- $\alpha$
HUVEC	humán köldökzsinór véna endothelsejt
HRP	torma peroxidáz
ICC	immuncitokémia
IDL	közepes sűrűségű lipoprotein
IGF1,2	inzulinszerű növekedési faktor receptor 1, 2
IHC	immunhisztokémia
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-6, 8	interleukin-6,-8
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
IR	inzulin receptor
LAT1	nagy neutrális aminosav transzporter
LDH test	tejsav-dehidrogenáz
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
LDLr	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor

LOX1	oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein receptor
LFS	alacsony frekvenciás ingerlés
LPL	lipoprotein lipáz
LRP1	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1
LRP2	gp330/ alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 2
LTD	hosszú távú szinaptikus hatékonyság csökkenés
LTP	hosszú távú szinaptikus hatékonyság fokozódás
LXR- $\beta$	máj x receptor- $\beta$ (oxiszterin receptor)
MAP kinase	mitogén-aktivált fehérje kináz
MCP1	monocyta kemoattraktáns fehérje 1
MCT1	monokarboxilsav transzporter 1
Med. obl.-Pons	nyúltvelő, híd (Medulla oblongata-Pons)
MEOX2	mezenchimális homeobox fehérje 2
Mesenceph.	középagy (Mesencephalon)
MDA	malondialdehid
MRP	multidrog rezisztencia fehérje
MTP	mikroszomális triglicerid transzfer fehérje
MYOCD	myocardin
NFT	neurofibrilláris köteg
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav receptor
Ocln	okkludin
oxLDL	oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein
PDK	piruvát-dehidrogenáz kináz
PHF	páros helikális filamentum (paired helical filament)
PKC- $\gamma$	fehérje kináz C- $\gamma$
PLC- $\gamma$	foszfolipáz C- $\gamma$
PP1, 2A, 2B, 2C	fehérje foszfatáz 1, 2A, 2B, 2C
PP2A	Ser/Thr fehérje foszfatáz 2A
PPAR- $\gamma$	peroxiszóma proliferáció aktiváló receptor- $\gamma$
PPF	páros pulzus facilitáció (paired-pulse facilitation)
PSEN1,2	preszenilin1, 2
pTauSer/pTauThr	foszforilált Tau
RAGE	előrehaladott glikációs végtermékek receptora
RNS	reaktív nitrogén gyökök

ROS	reaktív oxigén gyökök
RT-CES	valós idejű sejtanalízis (real-time cell electronic sensing)
RXR- $\alpha$	retinsav x receptor- $\alpha$
S-100 $\beta$	S100 kalcium kötő fehérje- $\beta$
SAP kinase	stressz aktivált fehérje kináz
SF	nátrium-fluoreszcein
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SR-B1 (SCARB1)	oxLDL/HDL/glikoprotein E2 receptor (scavenger receptor class B, member 1)
Src-kinase	nemreceptor tirozin-kináz
SRF	szérumválaszfaktor
SREBP-1c	szterin szabályozóelem-kötő fehérje 1 c
TBS	theta-burst stimuláció
TBARS	tiobarbitúrsav reaktív anyagok
TfR	transzferrin receptor
Tg	transzgenikus
TJ	szoros kapcsolat/ zonula occludens (tight junction)
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor- $\alpha$
tPA	szöveti plazminogén aktivátor
TTBK	Tau-tubulin kináz
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
VLDL	nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein
Wt	vad típus
ZO1 (Tjp-1)	szoros kapcsolat fehérje 1 (ZO-1)

# 1. Bevezetés/Irodalmi áttekintés

## 1.1. A plazmalipidek transzportja

A trigliceridek, a koleszterin és a hosszabb szénláncú zsírsavak nem vagy alig vízoldékonyak, ezért vérben való transzportjuk csak segítő mechanizmusok révén valósulhat meg: a szabad zsírsavak albuminhoz kapcsolódva, a trigliceridek és a koleszterin koleszterin-észter lipoproteinek belsejében szállítódnak.

## 1.2. A lipoproteinek felépítése, szerkezete

A lipoproteinek egy trigliceridekből és koleszterin-észterekből álló hidrofób magból, és ezt körülvevő foszfolipid membránból épülnek fel, amelybe fehérjék, apoproteinek ágyazódnak. Az apoproteinek fontos szerepet játszanak a lipoproteinek receptorokhoz való kapcsolódásában, enzimek aktiválásában, sőt önmaguk is katalizálhatnak kémiai és transzportfolyamatokat. A lipoproteinek apoprotein-tartalma jellemző az egyes típusokra, de egymás közötti kicserélődésük is lehetséges. A lipoproteinek feladata a sejtek lipidekkel történő ellátása és a felesleges lipidek elszállítása. Emellett részt vesznek egyéb anyagok, pl. szteroid hormonok, karotinoidok és tokoferol szállításában is.

A lipoproteineket méretük és denzitásuk alapján különítjük el, ami szorosan összefügg lipid- és fehérjetartalmukkal. Így megkülönböztetünk chylomicronokat, (amelyek az exogén eredetű lipidek transzportjában fontosak), nagyon alacsony sűrűségű lipoproteineket (VLDL), közepes sűrűségű lipoproteineket (IDL), alacsony sűrűségű lipoproteineket (LDL), nagy sűrűségű lipoproteineket (HDL) és koleszterin-észter transzfer fehérjét (CETP), amelyek a trigliceridek és a koleszterin szállítását végzik.

## 1.3. Az Apolipoprotein B (ApoB) élettani szerepe

Az ApoB-nek két formája létezik: ApoB-100 és ApoB-48. Mindkét forma egyazon struktúrgén (*APOB*) terméke. Az ApoB-100 egy 512 kDa-os glikoprotein (4536 aminosav), amelyet a hepatocyták szintetizálnak. A VLDL, IDL és LDL molekulák apoprotein komponense.

Az ApoB-48 az enterocyták szintetizálta chylomicronok apoproteinje. Az *APOB* gén által kódolt fehérje 48%-a, annak csupán N-terminálisát tartalmazza (2152 aminosav). A két forma létezésének oka, hogy a transzkripció során a mRNS-ben egy glutamint (Gln) jelentő CAA kodon UAA stop kodonná alakul dezaminálás révén. Az így képződő ApoB-48 ugyan



képes lipoprotein-tartalmú vezikulumokat képezni, de nem tud az LDL receptorhoz (LDLr: low-density lipoprotein receptor) kötődni. Az ApoB-48 az Apolipoprotein E-vel (ApoE) együtt a chylomicronok receptorfelismerésében játszik szerepet.

Az ApoB biokémiai funkciója kettős: részt vesz a VLDL és chylomicron-szintézisben, valamint az LDL receptoron keresztüli internalizációjában. Az ApoB szintézise szigorúan szabályozott folyamat, melyet befolyásol: az inzulin, a szteroidok valamint a sejt koleszterin- és trigliceridtartalma.

#### 1.4. Az ApoB-hez kötődő rendellenességek

Az ApoB az emlősök főtájs membránjaiban is expresszálódik, jelezve, hogy már az embriogenezis során fontos szerepet tölt be. Farese és mtsai. (1995) igazolták, hogy az *APOB* deficiencia egerekben letális fenotípust eredményez. Homozigóta *APOB* K.O. embriók már a gesztációs periódus felét sem érik meg, ha mégis, akkor exencephalia miatt életképtelenek. A heterozigóta *APOB* K.O. egerek a következő fenotípust mutatják: 20%-kal csökkent plazmakoleszterin-szint, 70%-kal csökkent plazma-ApoB-szint, csökkent migráló pre- $\beta$ - (VLDL) és  $\beta$ -lipoprotein-frakció (LDL). Magas koleszterintartalmú diétán tartva védettek a diéta indukálta hiperkoleszterinémiával szemben, így hipobetalipoproteinémia modellezésére is alkalmasak. Homanics és mtsai. (1993) is hasonló fejlődési rendellenességre lettek figyelmesek familiáris hipobetalipoproteinémia modellezése során. Egérmodelljükben csonka ApoB (ApoB-48 és ApoB-70) termelést valósítottak meg, azonban homozigótákban ez gyakran exencephaliával és hydrocephaliával járt együtt.

Emberben az autoszomális recesszíven öröklődő null allél homozigótákban (abetalipoproteinemia) az ApoB teljes hiányán keresztül intesztinális zsírsavfelvételi zavarokat okoz. A klinikai tünetek korán, néhány hetes korban jelentkeznek: neuropathiás ataxia, retinitis pigmentosa, acanthocytosis, myopathia. Az idegrendszeri tünetek a mielin érintettsége, a látászavarok a tokoferol és az A-vitamin hiánya miatt jelentkeznek.

Mutáns *APOB* allélt hordozó homozigóta egyénekben (familiáris hipobetalipoproteinémia) csonka méretű ApoB fehérje képződik. Ennek következtében VLDL ugyan termelődik a májban, de nem tud tovább alakulni LDL-lé. Klinikai tünetei megegyeznek az abetalipoproteinémiáéval. Heterozigótákban az ApoB és LDLr mennyisége fele vagy harmada a normálisnak, ezért az ilyen egyének legtöbbször tünetmentesek; az alacsony koleszterinszint miatt még a coronariabetegségekkel szemben is védettek.

A hiperlipidémia a koleszterin/triglicerid vagy mindkettő rendellenesen magas szintje a vérben. Jóllehet tünetmentes, mégis növeli bizonyos betegségek kockázatát: szívinfarktusra (myocardialis infarctus), érlemeszesedéssel (atherosclerosis) járó betegségekre hajlamosít. A kardiovaszkuláris betegségek, a rákos megbetegedéseket is megelőzve, vezető haláloknak számítanak, a halálos esetek 48%-áért felelősek világszerte (2012-es adat, forrás: <http://www.who.int/en/>). Ezen betegségek háttérében legtöbbször az atherosclerosis áll. Kiváltója a magas VLDL- és kis denzitású LDL-szint (small dense LDL), ami a szérumban lipoprotein-összetételének megváltozását (dyslipidemia) is maga után vonja. Az érlemeszesedés kialakulásának veszélyét növeli: a dohányzás, a magas vérnyomás (hypertonia), a cukorbetegség (diabetes mellitus), az elhízás (obesitas), a szérumban lipidek szintjének életkorral való fokozatos emelkedése és a mozgásszegény életmód. A szérumban lipidek szintjét befolyásolják a genetikai tényezők, a pajzsmirigy-alulműködés (hypothyreosis) és az alkoholfogyasztás is.

Tartósan magas plazmakoleszterin-szint esetén hiperkoleszterinémia alakul ki, aminek következtében a koleszterin lerakódásával plakkok (xanthoma) alakulnak ki az egész szervezetben: a bőrön, az ízületekben, az idegrendszerben, az inak mentén és az artériákban. Genetikailag öröklődő változata a familiáris hiperkoleszterinémia. A heterozigóták koleszterinszintje már születésüktől fogva a normálisnak mintegy kétszerese, a xanthomák és myocardialis infarctus kialakulása 30 év fölött várható. Homozigótáknál ugyanezek a tünetek már 4 éves korban jelentkezhetnek, így ezek a betegek általában nem érik meg már a 20. életévüket sem. A magas LDL-szint a receptor csökkent működésére vezethető vissza.

Az ApoB-100 tehát alapvető fontosságú a lipoprotein-metabolizmusban és a plazmalipid-transzportban, illetve esszenciális része mindazoknak a lipoproteineknek (VLDL, LDL), amelyek elsődleges szerepet játszanak az atherosclerosis kialakulásában.

Az atherosclerosis egy lassan progrediáló, komplex artériabetegség, melynek legjellemzőbb tünete az erek intimájában megjelenő  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú plakk (atheroma). Súlyos szövődményei lehetnek, mint az érlumen beszűkülése (carotis stenosis), vérzés (haemorrhagia), a plakkok gyulladása (ulcus) és felszakadása (thrombosis, embolia) vagy az elvékonyodott erek kitágulása (aneurysma). A betegség során kéttípusú plakk alakulhat ki: sejtzegény, de kötőszöveti mátrixban gazdag, azaz stabil. Ez a fajta a mechanikai terheléseknek jól ellenáll, így klinikailag hosszú távon „néma”. Lehet sejtekben és lipidekben gazdag, azaz instabil, ami könnyen megreped és trombogénné válik, ami az erek okklúziójához és szöveti ischémiához vezet. Erre a típusra kevés simaizom komponens és

vékony fibrotikus sapka jellemző. Érelmeszesedés által leggyakrabban az agy (stroke), a szív koszorús- (myocardialis infarctus) és az alsóvégtagok erei (gangraena) érintettek.

### 1.5. Lipoproteinek a központi idegrendszerben

Az első lipoproteinekkel kapcsolatos tanulmányok a cerebrospinális folyadék lipoprotein-összetételére fókuszáltak. Megállapították, hogy a cerebrospinális folyadék lipoproteinjei is többnyire szférikusak, méretben és denzitásban pedig a plazma-HDL-hez hasonlítanak. Perifériás megfelelőikhez hasonlóan lipidmagból és észteressített koleszterinből épülnek fel (Martins és mtsai. 2009, Skinner 2002). A plazmától eltérően a cerebrospinális folyadékban ApoE, ApoA-I, ApoA-II és ApoJ található meg nagy mennyiségben. Más apolipoproteinek, mint ApoA-IV, ApoD és ApoH is megtalálhatók a cerebrospinális folyadékban (Koch és mtsai. 2001). Néhány cerebrospinális folyadékban megtalálható apolipoprotein (pl. ApoE, ApoJ) az amiloid-bétával ( $A\beta$ ) is összefüggésbe hozható (LaDu és mtsai. 200), ami arra utal, hogy részt vesznek az  $A\beta$  polimerizációjában, transzportjában és eltávolításában (clearance). A cerebrospinális folyadék lipoproteinjeinek forrásai a plexus chorioideus epithelium, illetve az astrocyták.

Habár a vér-agy gát a kisebb HDL-szerű partikulumok (ApoA-I, ApoA-II) számára átjárható, a központi idegrendszer lipoproteinjeinek zöme helyben, *de novo* képződik (Wang és mtsai. 2014). Ismert, hogy a HDL-nél nagyobb denzitású partikulumok, így az ApoE-, illetve ApoB-tartalmú lipoproteinek nem képesek átjutni a vér-agy gáton. Az ApoB-vel ellentétben az ApoE agyban és cerebrospinális folyadékban is nagy mennyiségben jelen van (Wang és mtsai. 2014, Lajtha 2009, Skinner 2002).

Mai ismereteink szerint az agyban biztosan megtalálható, ott szintetizálódó lipoproteinek a következők: ApoE, ApoA-IV, ApoD és ApoJ. A mindezek mellett alacsony koncentrációban előforduló egyéb apolipoproteinek (kivéve ApoB) perifériás eredetűnek tekintendők, jelenlétük a plazmából történt infiltrációval magyarázható, hiszen mRNS szinten a fentieken kívül egyéb apolipoprotein jelenlétét eddig még nem igazolták (Skinner 2002, Lajtha 2009, Wang és mtsai. 2014).

Az agyban legnagyobb mennyiségben előforduló ApoE elsődleges forrásai az astrocyták (Yu és mtsai. 2007), de sérülés hatására mikroglia és neuronok is szekretálják (Wang és mtsai. 2014). Idegi sérülés során a degradálódó sejtek koleszterintartalmát a regenerálódó neuronokhoz szállítja, elősegítve az axonnövekedést és a szinaptogenezist. Az ApoE expressziója az életkorral fokozatosan csökken. Az ApoE tartalmú lipoproteinek három

legfontosabb funkciója az agyban: a foszfolipidek és a koleszterin szállítása ABC (ABC: ATP-binding cassette) transzporterek (ABCA1, ABCG1) segítségével; az LDLr család fehérjéivel való kölcsönhatás a neuronok felszínén (axonnövekedés, sejt túlélés elősegítése); kölcsönhatás az LRP1-en keresztül megvalósuló celluláris koleszterin felvételi és A $\beta$ -clearance úttal (Lajtha 2009). Bár minimális direkt kölcsönhatás van az ApoE és a szolubilis A $\beta$  között a cerebrospinális folyadékban, az ApoE izoformák mégis képesek szabályozni a szolubilis A $\beta$ -metabolizmust azáltal, hogy astrocytákban versenyeznek az A $\beta$ -val a LRP1-hez való kötődésért (Verghese és mtsai. 2013). Az ApoE három izoformája ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4) közül az  $\epsilon$ 4 az Alzheimer-kór egyik ismert genetikai hajlamosító tényezője (Huang, 2011). Az  $\epsilon$ 4 allél expressziója fokozza az ApoC kifejeződését. Humán ApoC1-et overexpresszáló transzgenikus egerek károsodott tanulási és memóriefolyamatokat mutatnak (Abildayeva és mtsai. 2008). Az  $\epsilon$ 2 és  $\epsilon$ 3 izoformák szelektív expressziója ApoE K.O. háttérén neuronokban és astrocytákban védi a szinapszisokat és dendrittüskéket a glutaminsav-excitotoxicitásával szemben, sőt az  $\epsilon$ 4 allél astrocytákban szintén protektív hatású. A neuronális  $\epsilon$ 4 expresszió azonban a kortikális neuronok pusztulását okozza glutaminsav-excitotoxicitást követően (Buttini és mtsai. 2010). Említést érdemel, hogy izoformái által az ApoE képes a Tau-fehérje foszforilációját, ezáltal a neurofibrilláris kötegek kialakulását is szabályozni.

Az ApoJ-t (clusterin) főként astrocyták, neuronok és ependymasejtek termelik. Expressziója az életkor előrehaladtával fokozatosan növekszik. Az ApoJ egy multifunkciós glikoprotein, amely neuronális vagy agyi sérülés, illetve stressz hatására nagymértékben termelődik, továbbá a sejtadhézióban, a komplementrendszer gátlásában és az A $\beta$  eltávolításában is fontos szerepet játszik (Lajtha 2009, Skinner 2002).

Az ApoD-t astrocyták és oligodendrocyták szintetizálják a hippocampusban. Kis affinitással koleszterint, nagy affinitással arachidonsavat, progeszteront és pregnenolont szállít. Mennyisége elsősorban idegi sérülés következtében emelkedik meg, ezért feltételezik, hogy fontos szerepet tölt be az idegi regenerációban (Lajtha 2009, Skinner 2002).

Az ApoA-IV a plazmához képest jóval alacsonyabb mennyiségben van jelen az agyban és a cerebrospinális folyadékban. Szintézisét számtalan csoport próbálta igazolni, eddig sikertelenül. Jelenlétét az agyban ezért plazmából való diffúzióval vagy transzporttal magyarázzák (Lajtha 2009, Skinner 2002).

## 1.6. A központi idegrendszer koleszterin-homeosztázisa

A központi idegrendszer lipidmetabolizmusa nagyon intenzív. Mind a neuronok, mind a gliasejtek membránigénye hatalmas, ezért itt szintetizálódik a legnagyobb számú lipidösszetevő. Jellemzőek a hosszú szénláncú (>24 C-atom) struktúrlipidek, melyek koleszterin-észterként, cerebrozidok, gangliozidok vagy szfingomielin összetevőiként vannak jelen.

A koleszterin a biológiai membránok nélkülözhetetlen építőköve, befolyásolja a membrándinamikát és a sejtszintű stabilitást. Vitaminok, szteroidok és epesavak prekursora, emellett számos enzim és receptor működését szabályozza. A szterinek a központi idegrendszerben főként észteresítetlen koleszterin formájában vannak jelen (>99,5%), de kis mennyiségben megtalálhatók dezmoszterinek és koleszterin-észterek is. Legnagyobb koleszterinszükséglete a mielinhüvelynek van, melynek lipidtartalma közel 70%. A koleszterin az idegsejtek membránjában nélkülözhetetlen a membránhoz kapcsolt enzimek, receptorok, ioncsatornák és endocitózis szabályozásához.

A vér-agy gátnak köszönhetően, amely hatékonyan megakadályozza a lipoproteinek által közvetített koleszterin transzportot a központi idegrendszer irányába; koleszterin az agyban csak *de novo* szintézis útján keletkezik (Hayashi 2011). Dacára annak, hogy az endothelsejtek LDLr, SR-B1, illetve ABCA1 mRNS-t is expresszálnak, gyakorlatilag nincsen rajtuk keresztül megvalósuló koleszterintranszport a perifériáról (Gosselet és mtsai. 2009). A koleszterin szintézise és felvétele az agyban az astrocyták és neuronok összehangolt működése révén valósul meg (Kramer 2005). Az astrocyták által termelt koleszterin ApoE segítségével szekretálódik és jut el a neuronokhoz, amik LDL receptorok segítségével felveszik, majd metabolizmusuk során 24-S-hidroxikoleszterinné alakítják. Az ApoE mellett az ABC transzporterek is ingázó (shuttle) funkciót töltenek be, a gliasejtektől a neuronokhoz szállítják a koleszterint (Lajtha 2009). A központi idegrendszer sejtjei máj x receptor bétát (LXR- $\beta$ ) expresszálnak, ami az ABC transzporterek működését (pl. ABCA1) szabályozza (Wang és mtsai. 2002). Az újonnan szintetizált koleszterin ritkán alakul át koleszterin-észterekké, ráadásul a féléletideje is hosszabb (mintegy 5 év), mint a periférián (napok). A legaktívabb koleszterinszintézis a mielinizáció során történik, ami emberben a terhesség második trimeszterétől 2 éves korig tart. A mielinizációt követően, a koleszterinszintézis mértéke csökken (Vance és mtsai. 2005).

Az agy koleszterin homeosztázisának fenntartásához a szintézis mellett a hatékony koleszterin efflux is hozzájárul. Sejtszinten az effluxot az astrocyták apolipoproteinek vagy

lipoprotein-partikulumok segítségével valósítják meg, míg a neuronok kizárólag lipoprotein-partikulumok segítségével távolítják el a koleszterint. Szervi szinten az efflux két módon valósulhat meg: ApoE-hez kötötten a cerebrospinális folyadékon keresztül (1-2 mg/24 h), vagy 24-S-hidroxikoleszterinné alakulva szabad diffúzióval a vér-agy gáton keresztül (Lajtha 2009, Björkham és mtsai. 2004).

### 1.7. Neurodegeneráció

A neurodegeneratív folyamat lehet akut (fejsérülés vagy stroke következménye), illetve progresszív. A leggyakoribb, életkortól független progresszív betegség a Sclerosis multiplex és az Amyotrophiás lateral sclerosis, életkorfüggő pedig az Parkinson-kór és az Alzheimer-betegség. A neurodegeneratív betegségek heterogének, mind fenotípusukat, mind kiváltó okukat tekintve. Többnyire a szürkeállományt érintik. Jellemző a neuronok fokozatos pusztulása és a fehérállomány másodlagos károsodása. A betegségek lényeges bevezető nélkül jelentkeznék, előzetes neurológiai problémáktól mentes egyéneknél. Általános, közös patogén folyamat a mutáns vagy sérült fehérjék abnormális felhalmozódása és aggregátum képzése, amelyek részben extracellulárisan helyezkednek el, részben viszont intracelluláris zárványokat alkotnak. Ugyanaz a fehérjeaggregátum azonban többféle betegségben is megjelenhet, emiatt sokszor nem könnyű a neurodegeneratív betegségek egymástól való elkülönítése. A taupathiák nagy családja pl. az Alzheimer-kóron kívül a Niemann-Pick-betegséget, a frontotemporális demenciát és a Parkinson-kórt is magába foglalja. Az idegsejtek károsodásának, pusztulásának a helye a legtöbb betegség esetében régió-, sőt sejtspecifikus, legalábbis a betegség korai szakaszában. A kórképek közös mechanizmusa az, hogy a fehérjék valamennyi esetben konformációváltozást szenvednek ( $\alpha$ -helikálisból  $\beta$ -redőssé alakulnak) és  $\beta$ -szerkezetű polipeptidláncokat tartalmazó száalakká, fibrillumokká rendeződnek. A fibrillumok, sőt a kisebb, diffúzibilis aggregátumok is enzimrezisztensek és neurotoxikus hatásúak.

A neurodegeneráció klinikai megnyilvánulása a demencia, amely komplex tünetegyüttest takar: a kognitív funkciók károsodásával, az értelmi képességek fokozatos romlásával és memóriazavarral jár. A demencia legjelentősebb kockázati tényezője az életkor: általában 60-65 év fölött jelentkezik. A demencia prevalenciája 60 év felett 5-7% között van, 2010-ben mintegy 35,6 millió demens beteget tartottak nyilván világszerte. Becslések szerint a demens betegek száma 20 évenként kétszereződni fog (forrás: <http://www.who.int/en/>). A demenciának több mint száz típusa ismert, leggyakoribb formája az Alzheimer-kór. A demens

esetek mintegy 60-80%-ának hátterében ez a rendellenesség áll. Az esetek 95%-ában a kiváltók ismeretlen (sporadikus), míg a maradék 5% bizonyítottan genetikai okokra (familiális) vezethető vissza (forrás: <http://www.alz.org/>).

A sporadikus vagy késői megjelenésű Alzheimer-kór kialakulásának pontos oka ismeretlen. Mai ismereteink alapján a betegség multifaktoriális eredetűnek látszik. A neurotoxikus A $\beta$  szintéziséért, illetve lebontásáért felelős proteázok egyensúlyának zavara, a szabadgyökök megkötéséért felelős enzimek alulműködése, az idegsejtekben folyó ATP-termelés csökkenése, a vér-agy gát permeabilitásának megnövekedése egyaránt hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához. Általában 65 év felett jelentkezik, klinikai és hisztopatológiai megjelenésében azonban nem különbözik az örökletes formától (Zlokovic, 2008 b).

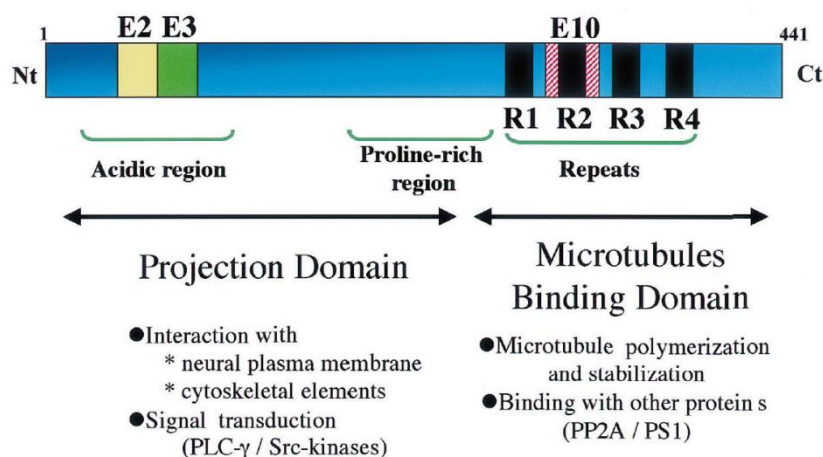
A familiális változat az amiloid prekursor protein (APP) és a preszenilinek (PSEN1, PSEN2) autoszomális dominánsan öröklődő mutációja következtében alakul ki, ezért a betegség fiatal korban (kb. 20 év) kezdődik (Zlokovic 2008 a, b). A viszonylag ritka mutációk mellett az Alzheimer-kór komoly rizikófaktora az ApoE fehérje polimorfizmusa. Az  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 allél védő hatású, viszont az  $\epsilon$ 4 allél jelenléte 17-szeresére növeli az Alzheimer-kór kialakulásának gyakoriságát (Folin és mtsai. 2005). Az eddigi vizsgálatok szerint az Alzheimer-kóros esetek 15-20%-áért az ApoE  $\epsilon$ 4-es alléljének jelenléte a felelős (Dias és mtsai. 2014). Az Alzheimer-kór jellemző hisztopatológiai jegyei: az agyszövet nagyfokú atrofíája, extracelluláris amiloid plakkok és intracelluláris neurofibrilláris kötegek megjelenése. A betegség elsősorban a szinapszisok és a cholinerg neuronok pusztulásával jár. Feltűnő a neuronok mitokondriumainak sérülése, elfajulása, ami komoly ATP-hiányt okoz.

A neuronpusztulás sejtszintű és molekuláris mechanizmusát a Hardy-féle amiloid-kaskád hipotézis (1992) alapján (1. ábra) a következőképpen képzeljük el: Kisebb-nagyobb agyi traumák, hipoxia, esetleg genetikai faktorok APP túltermeléshez vezetnek (amiloidogén út) és (a  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretázok hasítása által) nagy mennyiségű A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid képződik. Ezek a peptidek a sejtek felszínén és az extracelluláris térben különböző nagyságú és formájú neurotoxikus aggregátumokat képeznek, amelyek megkötődnek a neuronok membránján. (A monomer A $\beta$  nem toxikus.) A kötődés hatására Ca<sup>2+</sup>-ionok áramlanak be a sejtbe, és mivel az amiloid aggregátum enzimrezisztens, tartósan ott marad a membránon, és a Ca<sup>2+</sup>-beáramlás állandósul. A Ca<sup>2+</sup>-jel kinázokat (Cdk5, GSK3- $\beta$ ) aktivál és megkezdődik a Tau-fehérjék hiperfoszforilációja, aminek következtében a mikrotubulus hálózat dezintegrálódik. A hiperfoszforilált Tau-fehérjék lassan neurofibrilláris kötegekké aggregálódnak. A magas intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint károsítja a mitokondriumokat, aminek

The diagram illustrates the processing of the Amyloid Precursor Protein (APP) and the resulting pathways to Alzheimer's disease. The full-length APP (NH<sub>2</sub>-COOH) is shown with KPI binding to the NH<sub>2</sub> terminus. APP is cleaved by α-secretase or β-secretase. α-secretase cleavage produces APPsα and α-stub. β-secretase cleavage produces APPsβ and β-stub. APPsβ is further cleaved by γ-secretase to produce Aβ<sub>42</sub>. APPsα is cleaved by γ-secretase to produce P3. Aβ<sub>42</sub> can lead to fibrillogenesis and neurotoxicity, or be degraded by ApoE, LRP/RAGE/A2M, IDE, or neprilysin. Mutations are shown: APP Swedish mutation promotes β-secretase cleavage; APP Flemish/Dutch/Arctic mutations promote α-secretase cleavage; PS1/PS2 and APP TM mutations promote γ-secretase cleavage of APPsβ.

A neurodegeneratív folyamatok másik fontos résztvevője a Tau-fehérje, amely a mikrotubulus-asszociált fehérjék családjába tartozik. Főként neuronokban expresszálódik, de patológias körülmények között gliasejtek is termelik. Perifériás szervekben és sejtekben is előfordul, mint: a szív, a tüdő, a vese, a hasnyálmirigy, izom, here, és fibroblasztok. Az alternatív splicingnak köszönhetően hat izoformája létezik, amiből öt felnőttkori, egy pedig főtálas. Jellemzően 352-441 aminosav hosszúak 45-65 kDa tömegűek, ezáltal az egyes Tau-variánsok méretben különböznek egymástól (Buée és mtsai. 2000).





2. ábra: A Tau-fehérje domén szerkezete (Forrás: Buée és mtsai. 2000)

Szerkezeti felépítését tekintve (Buée és mtsai. 2000) az N-terminális részén (2. ábra) projekciós domén található, aminek segítségével a plazmamembrán és a citoszkeleton elemeivel (aktin, spektrin), a PLC- $\gamma$ -val és az Src-kinázokkal lép kapcsolatba. Ez a domén határozza meg a továbbá az axonokban egymás mellé rendeződő mikrotubulusok egymáshoz képesti távolságát, ezáltal az axonok vastagságát. C-terminálisa (2. ábra) mikrotubuluskötő domént tartalmaz, amely elsősorban a tubulin polimerizációjáért, illetve a PSEN1, PP2A fehérjék kötéseért felelős. Ez a domén szabályozza a fehérje foszforiláltsági állapotát, hiszen a 79 ismert Ser, Thr és Pro foszforilációs hely nagy része itt található. (A foszforiláció egyszerre több helyet is érinthet.)

A foszforilációs helyek egy-két kivételtől eltekintve (Ser<sup>262</sup>, 285, 305, 324, 352, 356) a mikrotubuluskötő domén külső részén helyezkednek el. A fehérje foszforiláltsági állapota a celluláris kinázok (PDK, MAP, GSK3, Tau-tubulin kináz, Cdc2, Cdk5, SAP) és foszfatázok (PP1, 2A, 2B, 2C) egyensúlyától függ (Gong és mtsai. 2000, Liu és mtsai. 2002). Ismert, hogy a hideg víz és a hősokk azonnali Tau-foszforilációt indukál (Buée és mtsai. 2000). A foszforiláció csökkenti a Tau mikrotubulusokhoz való affinitását, ezáltal a tubulin polimerizációját. A Ser<sup>262</sup>-es hely foszforilációja drámai affinitáscsökkenést vált ki, ami önmagában azonban nem elegendő ahhoz, hogy a Tau-tubulin kapcsolat véglegesen megszűnjön (Buée és mtsai. 2000). A Ser<sup>262</sup>-es hely valamennyi Tau-izofórmában (felnőtt, főtális) és a neurofibrilláris kötegekben foszforilált.

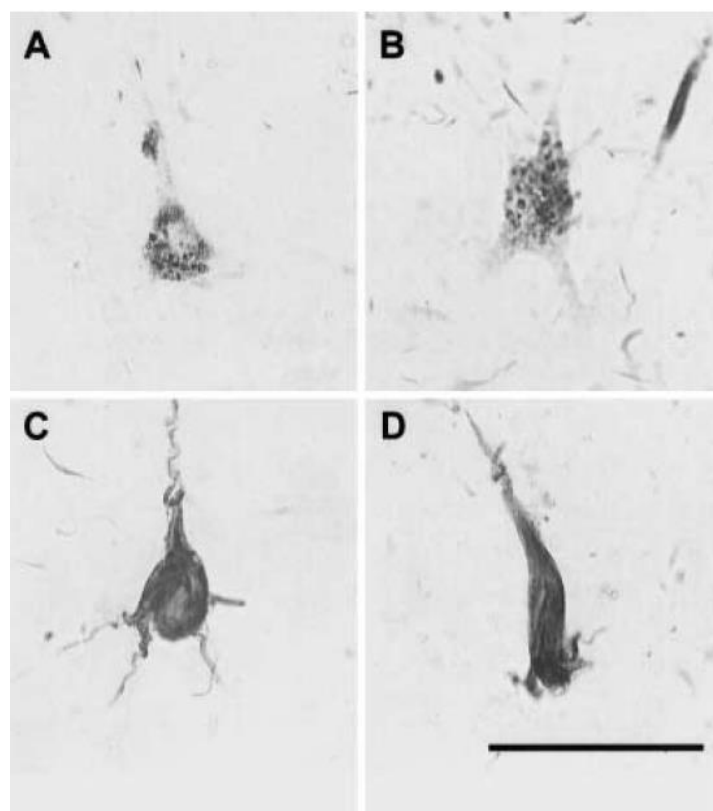
A Tau elsősorban axonális fehérjeként ismert, bár kisebb mennyiségben a neuronok valamennyi kompartmentjében megtalálható, ami a foszforiláltsági állapotát is nagymértékben meghatározza. A fehérje foszforilációs állapota az egyes fejlődési stádiumokban eltérő: főtálisan még nagymértékben hiperfoszforilált, majd felnőtt korra

foszforiláltságának mértéke jelentősen csökken (Buée és mtsai. 2000). Az aggregálódott Tau-fehérjéken, akárcsak a natívakon, számos foszforilációs hely található. Néhálynak azonban kitüntetett szerepe van. Megállapították, hogy Alzheimer-kóros betegekben rendre a következők fordulnak elő (az ismert 19 foszforilációs hely közül): Ser<sup>202, 262, 396, 404</sup> és Thr<sup>205</sup> (Buée és mtsai. 2000, Augustinac és mtsai. 2002). A foszforiláció rendkívül érzékeny folyamat, ezért a hiperfoszforiláció detektálása csak kicsi időablakban lehetséges. Ischemia következtében a Tau-fehérjék gyorsan, mintegy 2 órán belül defoszforilálódnak (kivéve: páros helikális filamentális-Tau), így a szöveti ischemia korai markereiként is használhatók, akárcsak a CaMK2 (Buée és mtsai. 2000). A foszforilációs helyek és az izoformák kombinációi tehát együttesen határozzák meg a Tau-fehérje funkcióját. Mivel a Tau-fehérjék a mikrotubulus hálózat stabilizálását végzik, fontos szerepük van az axonnövekedésben és transzportban, a sejt morfológiájának, valamint polaritásának kialakításában és fenntartásában.

Ismert, hogy Alzheimer-kór során a Tau-fehérjék aggregálódnak és sejten belüli neurofibrilláris kötegeket, illetve ezekbe integrálódó páros helikális filamentumokat képeznek. A neurofibrilláris kötegek (NFT) elsősorban az entorhinális kéreg és a hippocampus piramis sejtjeiben, illetve az asszociációs kéreg I-III. és V-VI. rétegében jelennek meg (Buée és mtsai. 2000). A neurofibrilláris léziók kisebb sűrűségben egészséges idősök agyában is előfordulnak. A páros helikális filamentumok (PHF) intracelluláris filamentózus lerakódások, melyek fő immunogén komponensei a hiperfoszforilált 55, 64, illetve 69 kDa-os Tau-fehérjék (Tau-triplet). A PHF-Tauk savasabb karakterűek, azonban ugyanúgy aggregálódnak és hiperfoszforilálódnak, mint a NFT-Tauk (Buée és mtsai. 2000). A natív Tau-fehérjék 55-74 kDa között három sávba rendeződnek (poliakrilamid gélelektroforézis) során, míg a PHF-Tauk az 55-69 kDa-os tartományban jelennek meg, amihez ritkán egy 74 kDa-os sáv társulhat. Egyszerű elektroforetikus azonosításukkal a neurofibrilláris degeneráció könnyen igazolható. Alzheimeres páciensekben a primer motoros és érző kéreg területén kívül minden agyterületen detektálhatók. Egészséges, 75 év feletti egyéneknél is kimutathatók a hippocampus és az entorhinális kéreg területén, természetesen sokkal kisebb mennyiségben (Buée és mtsai. 2000).

Kimura és mtsai. (1996), illetve Augustinac és mtsai. (2002) leírták, hogy a neurofibrilláris degeneráció kis, egymást követő lépésekben zajlik. Morfológiailag a következő fázisokat különítették el: pre-NFT, intra-neuronális és extra-neuronális NFT (3. ábra). Emellett megvizsgálták az egyes fázisokba sorolható Tauk foszforilációs mintázatát is. Ezek szerint a pre-NFT-Tauk a Ser<sup>199,202,409</sup>-es és a Thr<sup>153,175,181,231</sup>-es helyeken, az intra-

neuronális NFT-Tauk a Ser<sup>396,422,46,214,262,356</sup>-os és a Thr<sup>231</sup>-es helyeken, míg az extra-neuronális NFT-Tauk pedig főként a Ser<sup>396,404,199,202</sup>-es és a Thr<sup>205,212,214</sup>-es helyeken foszforiláltak. Megállapították továbbá, hogy a degeneráció kialakulásának és terjedésének határozott strukturális hierarchiája van: bizonyos területek korábban érintettek a többihez képest. A neurofibrilláris degeneráció a következő lépésekkel írható le (Augustinac és mtsai. 2002): Először az egészséges neuronokban pontszerű foszfo-Tau lerakódások jelennek meg (pre-NFT fázis 3. A, B ábra), amelyek filamentózus intracelluláris zárványokká alakulnak (intra-neuronális NFT fázis, 3. C ábra), végül a neuronok elpusztulnak, és helyükön extra-neuronális neurofibrilláris kötegek (extra-neuronális NFT fázis, 3. D ábra) vagy „szellemkötegek” (ghost tangle) maradnak vissza. A folyamat során újabb és újabb foszfo-epitópok jelennek meg, melyek szignálként szolgálhatnak az egyes kinázok aktivációjához.



3. ábra: A neurofibrilláris degeneráció morfológiai fázisai (Forrás: Augustinac és mtsai. 2002)

A neurofibrilláris degeneráció azonban nem Alzheimer-specifikus folyamat, neurofibrilláris köteggépződés jellemző még a Parkinson-kór, Amyotrophiás lateral sclerosis, szupranukleáris bénulás, kortikobazális degeneráció, frontotemporális demencia, Pick-betegség, Down-kór, sőt még prionbetegség során is, habár demenciás patológia kialakítására önmagában is képesek (Götz és Ittner 2008).

A Tau-fehérje mutációja frontotemporális demenciát okoz (Götz és Ittner 2008). A frontotemporális demencia főként viselkedésváltozásban nyilvánul meg, mint: dezinhibíció, a kezdeményezés hiánya, apátia, a környezet iránti érdeklődés hiánya, az ítélőképesség és intuíciók hiánya, a személyes higiénia elhanyagolása, verbális és fizikális agresszivitás, alkoholfüggőség, lustaság vagy hiperoralitás. A betegséget általában 60 éves kor körül diagnosztizálják. A betegek gyakran mutatnak asszimmetrikus kortikális atrófiát a frontális és temporális kéreg területén. Az frontotemporális demencia gyakran motoneuron betegséggel vagy Parkinson-kórral együtt fordul elő. Hisztológiailag neurofibrilláris kötegekkel jellemezhető, amelyek főként mutáns Tau-fehérjéből állnak. Érdekes módon a neurofibrilláris kötegek megjelenése nem korlátozódik kizárólag csak a neuronokra, astrocytákban és oligodendrocytákban is jelen vannak. A fehérje mutációinak ismeretében számos transzgenikus (humán és egér) Tau egértörzset hoztak létre, amelyekben neuronális és gliális neurofibrilláris köteggépződést, szinaptikus károsodást, idegsejtpusztulást, agykamra tágulatot, fokozott citokintermelést és mikroglia-aktivációt figyeltek meg (Götz és Ittner 2008, Adams és mtsai. 2009). A frontotemporális demencia egérmodelljein végzett vizsgálatok számos érdekes megfigyelést hoztak: kiderült, hogy a szolubilis Tau toxikusabb, mint a neurofibrilláris köteg-Tauk, továbbá, hogy a Tau az idegi gyulladás fontos eleme lehet, valamint, hogy a Tau transzgenikus egerek a frontotemporális demencia egyik fontos aspektusának, a szupranukleáris bénulásnak és a kortikobazális degenerációnak a modellezésére is alkalmasak, mert gliális patológiával is rendelkeznek (Götz és Ittner 2008).

#### 1.8. A hiperlipidémia és a neurodegeneráció kapcsolata

Az életkor előrehaladtával idegsejtjeink száma csökken, a felidéző működések lassulnak. Demenciáról (értelmi hanyatlás, elbutulás) akkor beszélünk, ha a kognitív képességek betegség következtében romlanak. A demencia tehát nem az öregkor természetes velejárója, hanem egy tünetegyüttes, amelynek fő összetevői az emlékezőképesség és ítélőképesség romlása, az agykérgi működések zavara és a személyiségváltozás. Kialakulásának mechanizmusa szerint lehet degeneratív elváltozás, érlemeszesedés, fertőzés (pl. HIV) vagy prionbetegség következménye. Hátterében leggyakrabban az Alzheimer-kór áll, mellette a vaszkuláris demenciák jelölhetők meg másodlagos kiváltó okként. Vaszkuláris demenciáról beszélünk minden olyan esetben, amikor a tünetek az agyi vérrellátás bármilyen okból bekövetkező zavara miatt alakulnak ki (Jellinger 2005, Jiwa és mtsai. 2010).

Megfigyelték, hogy a degeneratív és vaszkuláris elváltozások vagy akár ezek kombinációja egészséges egyénekben is előfordulhat, valamint azt is, hogy demencia lényeges neurológiai elváltozások nélkül is jelentkezhet. Számos klinikai tanulmány jutott arra a megállapításra, hogy Alzheimer-kóros páciensekben az ischemiás léziók jelenléte fokozza a kognitív funkciók romlását. Egészséges patkányokban az ischemia fokozza az APP expresszióját, illetve  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretázok általi hasítását. A képződő A $\beta$  gyulladáshoz mediátorok termelődését serkenti, amik fokozzák a poszt-ischemiás gyulladást, így hozzájárulnak a cerebrovaszkuláris diszfunkció kialakulásához (Zlokovic 2008, 2011). Amiloid plakkot nem képző APP transzgenikus egerekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy már az A $\beta$  szolubilis formája is elegendő ahhoz, hogy vaszkuláris és kognitív károsodást okozzon. Ez összhangban áll azzal a ténnyel, hogy nem az amiloid plakkok, sokkal inkább az A $\beta$  oligomerek felelősek a neuronális diszfunkcióért és kognitív károsodásért. Számos humán klinikai vizsgálat eredménye támasztja alá, hogy a vaszkuláris kockázati tényezők mind Alzheimer-kór, mind pedig vaszkuláris demencia esetén egyaránt fontosak, sőt legtöbbjük közös is (Jellinger 2007). Az Alzheimer-kór és vaszkuláris demencia kialakulására hajlamosító tényezők a következők: életkor, atherosclerosis, stroke, hypertonia, tranzienst ischemiás károsodás, szívbetegség, az ApoE  $\epsilon$ 4-es allélje, magas homociszteinszint, hiperlipidémia, metabolikus szindróma, obesitas, diabetes.

A vaszkuláris demencia a kognitív hanyatlás gyakori kiváltó oka idős korban, ami az esetek többségében aterogén diszlipidémiával és atherosclerosis-sal jár (Watanabe és mtsai. 2004). A magas szérumban LDL-koleszterinszint érelmeszesedéshez, hosszútávon pedig szívelégtelenséghez vezet (Cromwell és Barringer 2009). A VLDL és LDL molekulák fő apoprotein komponense az ApoB-100. Több tanulmány jut arra a következtetésre, hogy az ApoB-100 indukálta hiperlipidémia és atherosclerosis nem csupán a kardiovaszkuláris, hanem a cerebrovaszkuláris rendszert is érinti (Süle és mtsai. 2009, Martins és mtsai. 2009), ezáltal hozzájárul a neurodegeneratív betegségek kialakulásához (Martins és mtsai. 2009).

Ismertek olyan tanulmányok, melyek Alzheimer-kóros betegek szérumban magas ApoB-koncentrációt mutattak ki (Martins és mtsai. 2009, Caramelli és mtsai. 1999). Számos irodalmi adat igazolja, hogy a lipidhomeosztázis Alzheimer-kór és vaszkuláris demencia esetén zavart szenved, felborul. Ezekben az esetekben egyértelműen a szterin metabolizmus zavara érhető tetten (Lütjohann és mtsai. 2000). Epidemiológiai adatok támasztják alá, hogy azoknál a betegeknél, akik koleszterinszint-csökkentőt (sztatin) szednek, kisebb gyakorisággal alakul ki az Alzheimer-kór (Mathew és mtsai. 2011).

Alzheimeres betegek post mortem vizsgálata során azt találták, hogy bennük a szérumtriglicerid-, az ApoB- valamint az LDL- és összkoleszterinszint jelentősen megemelkedik (Martins és mtsai. 2009, Caramelli és mtsai. 1999, Sabbagh és mtsai. 2004), ami az  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$  fokozott termelődéséhez vezet (Kuo és mtsai. 1998). Mindezek mellett abnormálisan felhalmozódott apolipoproteineket és koleszterint mutattak ki az érett amiloid plakkok core régiójában (Puglielli és mtsai. 2003). Burns és mtsai. (2003) Alzheimer-kóros (AD) transzgenikus egerek fibrilláris amiloid plakkjaiban ApoE és koleszterin kolokalizációt mutattak ki. Hasonló megállapításra jutottak rágszálakon végzett etetési kísérletek során is. Koleszterindús táppal etetett egerek szérum-ApoB-szintje megemelkedik, ami fokozott amiloid-felhalmozódáshoz vezet (Shie és mtsai. 2002). Humán ApoB-100 transzgenikus egerek szérumlipoprotein-profil vizsgálata során azt találták, hogy az nagyon hasonló az Alzheimer-kórosokéhoz (Burgess és mtsai. 2006), vagyis magas triglicerid- és normál HDL-, illetve összkoleszterin-szint jellemzi (Bereczki és mtsai. 2008). Normál tápon tartva az egerek agyában a membrán-kötött APP mennyiségének csökkenését, míg magas koleszterintartalmú tápon tartva annak emelkedését figyelték meg (Bjelik és mtsai. 2006). Ezzel összefüggésben Xiong és mtsai. (2008) azt tapasztalták, hogy humán AD-os betegek agyszövetében, illetve sejtjeiben koleszterinretenció van, ami fokozza a  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretázok aktivitását, ezáltal az  $A\beta$  képződését. Ezzel párhuzamosan csökkent LXR- $\beta$ , peroxiszóma proliferáció aktiváló receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ) és retinsav x receptor-alfa (RXR- $\alpha$ ) expressziót mutattak ki, amely felelőssé tehető a sejtszintű koleszterin eltávolítás zavaráért.

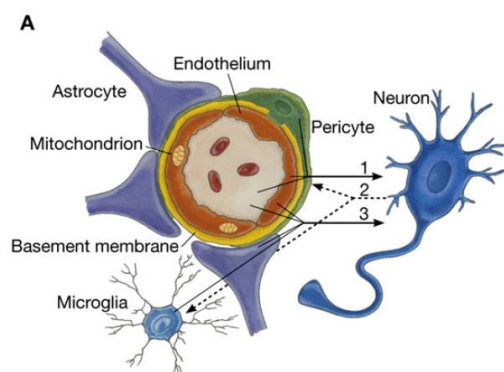
Humán vizsgálatok (Morley 2004, Reitz és mtsai. 2005) rámutattak arra, hogy az obesitas gyenge kognitív teljesítménnyel hozható összefüggésbe. A lehetséges hosszú távú kiváltó okok között a metabolikus szindróma több eleme is szerepel, mint a hiperglikémia és a diszlipidémia. Farr és mtsai. (2008) kimutatták, hogy az elhízás a kognitív funkciók romlását okozza azáltal, hogy a trigliceridek károsítják az hosszútávú szinaptikus hatékonyság fokozódás (LTP) N-metil-D-aszparaginsav receptor (NMDA) függő komponensét és oxidatív stresszt indukálnak. A trigliceridek mellett a telített zsírsavakról is bebizonyosodott, hogy tartós fogyasztásuk károsító hatással bír. Takechi és mtsai. (2010) telített zsírsavakat (palmitinsav, sztearinsav) tartalmazó táppal etettek egereket, aminek következtében a vér-agy gát megnyílását, illetve plazmafehérjék és ApoB agyba történő bejutását mutatták ki. Hisztológiai vizsgálatokat végezve azt találták, hogy az ApoB és az  $A\beta$  a plakkokban egymással kolokalizál, továbbá eloszlásuk megegyezik az AD modell (APP/PSEN1) egerekben tapasztalttal. Mindemellett pozitív korrelációt állapítottak meg a plazma eredetű ApoB, és az agyi amiloid felhalmozódás között. A vér-agy gát permeabilitásának

fokozódásával párhuzamosan a plazma-S-100 $\beta$  megnövekedett mennyiségét és csökkent cerebrovaszkuláris occludin expressziót tapasztaltak. Ezzel szemben az egyszeresen és többszörösen telítetlen zsírsavak a vér-agy gát integritását nem károsították.

#### 1.9. A cerebrovaszkuláris rendszer és a vér-agy gát felépítése

A cerebrovaszkuláris rendszer funkcionális egységekből épül fel. Ilyen a *neurovaszkuláris egység* (4. ábra), amely egy komplex, multicelluláris egység. Alkotói a kapilláris endothelsejtek, pericyták és az érfalat végtalpaikkal kívülről körülölelő astrocyták (Zlokovic 2011). A neurovaszkuláris rendszer másik funkcionális egysége a *gliovaszkuláris egység*, amely egyetlen astrocytához tartozó endothelsejtek és pericyták összességét jelenti.

A vér-agy gát tulajdonképpen a neurovaszkuláris egység specializált endothel struktúrája, amely az agyi (mikro)kapillárisok belső felszínét képezi, a pericytákkal, astrocytákkal és mikrogliaakkal együttműködve szeparálja a neuronokat a plazmában keringő sejtes elemektől (vörösvérsejt, leukocyt). Korlátozza xenobiotikumok, metabolitok, fertőzések és gyógyszerek bejutását az agyba (Marques és mtsai. 2013). Ezáltal biztosítva és fenntartva az érzékeny neuronális homeosztázist (ion, pH, ozmotikus) ami nélkülözhetetlen a neuronhálózatok, a szinaptikus transzmisszió és remodelling optimális működéséhez, valamint az angio- és neurogenesishez. Szigorúan szabályozott keretet biztosít az agy felé irányuló transzportfolyamatok számára, továbbá aktívan részt vesz a hemodinamikus neurovaszkuláris kapcsolat, a mikrovaszkuláris permeabilitás, a neurotransmitter inaktiváció, illetve a neurotróp kapcsolat szabályozásában (Zlokovic, 2008). A nem neuronális sejtek és neuronok egymással együttműködve szabályozzák az agyi vérátáramlást és a vér-agy gát permeabilitást (Marques és mtsai. 2013). Elsősorban a vaszkuláris és gliasejtek felelősek az intersticiális folyadék állandó kémiai miliójének megteremtéséért, míg a pericyták a vér-agy gáttal és a vér-liquor gáttal együttműködve megakadályozzák a potenciálisan neurotoxikus és vaszkulotoxikus makromolekuláknak a központi idegrendszerbe való bejutását (Zlokovic 2011).



4. ábra: A neurovaszkuláris egység felépítése, sejtípusai (Forrás: Zlokovic 2008)

#### 1.10. A vér-agy gát celluláris kapcsolatai

A vér-agy gát egymáshoz szorosan kapcsolódó endothelsejtek rétege, amelyek gátolják az oldott anyagok vér és agy közötti szabad kicserélődését. Kivételt képeznek ez alól a 400-500 Da alatti, kevesebb, mint kilenc H-kötést tartalmazó lipidoldékony kismolekulák, melyek segítség nélkül, szabad diffúzióval jutnak be az agyba (Pardridge 2002). Az endothelsejtek egymáshoz szoros (zonula occludens vagy TJ: tight junction) és adherens (zonula adherens vagy AJ: adherens junction) kapcsoló struktúrákkal kötődnek. Réskapcsolatokat (macula communicans vagy GJ: gap junction) is azonosítottak már a vér-agy gáton, de ezek barrier funkcióban betöltött szerepe egyelőre ismeretlen (Zlokovic 2008). A TJ fehérjék alakítják ki az agyi endothelre jellemző alacsony paracelluláris permeabilitást, magas transzendotheliális elektromos rezisztenciát, illetve a polarizált membránstruktúrát. Fizikailag szeparálják el egymástól a sejtmembrán apikális és bazális doménjeit. Az endotheliek ugyanis jellemzően polarizált membránnal rendelkeznek (Zlokovic, 2008, Dejana és mtsai. 2009).

Az agyi endothelen keresztül minimális a pinocitózis, így az oldott anyagok transzcelluláris transzportja a plazmából erőteljesen korlátozott. Az endothelsejtek két alapvető transzcelluláris mechanizmus segítségével látják el az agyat a szükséges tápanyagokkal: szabad diffúzióval és katalizált transzporttal (Pardridge 2002, Abbott és mtsai. 2006, Dejana és mtsai. 2009). A kisméretű vízdoldékony molekulák paracellulárisan, a TJ fehérjéken keresztül jutnak be az agyba. A katalizált transzport carrierek vagy receptorok segítségével valósul meg. A carrierek által megvalósuló transzport kis tápanyagmolekulákat szállít ms-os sebességgel, ide tartozik pl. a glükóz transzporter (Glut1), a nagy neutrális aminosav transzporter (LAT1), a mono-karboxilsav transzporter (MCT1) és az adenzin



transzporter (CNT2) (Abbott és mtsai. 2006, Dejana és mtsai. 2009). A vér-agy gáton expresszáldó receptorokat használó transzportrendszerek pl. az inzulin receptor (IR), a transferrin receptor (TfR), az IGF1 és 2 receptor és a leptin receptor (Pardridge 2002). A koncentrációgrádiens ellenében mozgatott komponensek transzportja energiát igényel, ami származhat ATP-ből (ABC és MRP transzporterek), illetve  $\text{Na}^+$ -koncentrációgrádiensből ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz működéséből).

#### 1.11. A vér-agy gát károsodása

A neurodegeneratív és cerebrovaszkuláris betegségek közös kiváltó eleme az agyi hipoperfúzió, az ennek következtében fellépő hipoxia és endothel diszfunkció, vagyis a vér-agy gát károsodása. A TJ fehérjék károsodása és az ennek következtében fellépő paracelluláris permeabilitás-fokozódás, az endothelen keresztüli fokozott transzcitózis (transzcelluláris permeabilitás), valamint a bazális membrán megvastagodása a vér-agy gát károsodásának fizikai megnyilvánulásai (Zlokovic 2011). A TJ, AJ és adaptor fehérjék mennyiségének csökkenése számos neurodegeneratív kórkép (demencia, Alzheimer-kór, Amyotrophiás lateral sclerosis, Sclerosis multiplex) során csökkenést mutat (Zlokovic 2008, Kalara 2010). Ez a csökkenés részben az ischemia következtében fellépő vaszkuláris mátrix-metalloproteázok mennyiségének vagy aktivitásának növekedésével magyarázható, amelyeknek mind a TJ fehérjék, mind az endothelsejtek, mind pedig a bazális membrán mátrixkomponensei egyformán szubsztátot jelentenek (Rosenberg 2009). A pericyta-endothel közötti kapcsolat nélkülözhetetlen a vér-agy gát kialakításában és funkciójának fenntartásában (Nakagawa és mtsai. 2007, Bell és mtsai. 2010). Ismert, hogy a pericyták hiánya vér-agy gát-károsodást okoz a TJ fehérjék (ZO1, Occludin, Cldn-5) expressziójának csökkenése által, ami fokozott paracelluláris permeabilitáshoz, illetve transzcitózishoz vezet (Bell és mtsai. 2010, Armulik és mtsai. 2010). Mindkét folyamat a plazmában keringő kis és nagy molekulák extravazációját okozza. Pericyta deficiens egerekben az életkorral progresszíven csökken a pericyták száma, ami vér-agy gát-károsodáshoz, mikrovaszkuláris degenerációhoz, neuronális diszfunkcióhoz, kognitív károsodáshoz és neurodegeneratív elváltozásokhoz vezet (Bell és mtsai. 2010). A pericyták lizoszómái számos exogén és endogén fehérjét tárolnak és bontanak le (szérum-immunglobulinok, fibrin), amelyek felszabadulnak és tovább károsítják a vér-agy gátat (Bell és mtsai. 2010, Broadwell és Salzman 1981). A vér-agy gát sérülése jellemzően különféle anyagok szövetbeli akkumulációját eredményezi. Az immunglobulinok és az albumin penetrációja ödémát, a

kapillárisok perfúziójának csökkenését; míg a trombin neurotoxikus hatása mellett memóriakárosodást, a vér-agy gát vaszkuláris dezintegrációjának felgyorsulását okozza (Bell és mtsai. 2010, Mhatre és mtsai. 2004). Az agyba kerülő plazmin a neuronális laminin lebontását katalizálja, így jelentős mértékben hozzájárul a neuronok sérüléséhez (Chan és Strickland 1997). A vörösvérsejtek számának növekedése káros hemoglobin-eredetű neurotoxikus termék pl. vas megjelenéséhez vezet, ami ROS termelődést indukál (Zhong és mtsai. 2009). A plazmafehérjék bejutása okozta vazogén ödéma mellett a lokális szöveti ischemia-hipoxia az ATP-és  $\text{Na}^+$ -raktárak kimerüléséhez vezet, aminek következtében az endothelsejtek és astrocyták duzzadni kezdenek (citotoxikus ödéma), amihez az AQP4 ischemia következtében megemelkedő expressziója is hozzájárul (Simard és mtsai. 2007, Hoshi és mtsai. 2011).

#### 1.12. A cerebrovaszkuláris rendszer hipoperfúzió és hipoxia hatására bekövetkező patológiás elváltozásai

Az agyi vérátáramlást a neuronok lokális aktivitása és metabolizmusa szabályozza (neurovascular coupling). Agyi aktiváció során a piális és intracerebrális erek szabályozzák az agyi vérátáramlás lokális növekedését (functional hyperaemia). A neurovaszkuláris kapcsolat megvalósulásához a piális keringés intaktsága, illetve a pericyták és a vaszkuláris simaizomsajtek vazoaktív stimulusokra adott egészséges válaszadó képessége szükséges (Zlokovic 2011). A vaszkuláris simaizomsejtek és pericyták a cerebrális artériák kontrakcióját és dilatációját, míg az astrocyták a kontraktilitásukat szabályozzák. Az öregedés során csökken az agyi vérátáramlás, változások következnek be az érrendszerben (Zlokovic 2008, 2011): Elvékonyodott, összeesett, acelluláris erek (string vessel) jelennek meg, a mikroerek denzitása jelentősen csökken; az endothelsejtek mitokondriumainak és TJ fehérjéinek száma csökken, fokozott pinocitózis jellemző; a bazális membránban kollagén és perlekán lerakódások jelennek meg; a funkcionális hiperaemia jellemzően csökken. Az ApoE  $\epsilon 4$ -es alléljét hordozó egyéneknél az agyi vérátáramlás nagyobb mértékű regionális redukciónak tapasztalták egészséges egyénekhez képest (Thambisetty és mtsai. 2010). A progresszív agyi vérátáramlás csökkenésnek drámai következményei vannak a neurokra nézve. Már a mérsékelt agyi vérátáramlás csökkenés (oligaemia) is szinaptikus plaszticitás változást (Iadecola 2004), míg a közepes vagy súlyos agyi vérátáramlás redukciónak neurotranszmissziós zavart (Kalaria 2010), a pH és elektrolit egyensúly felborulását, ödéma és fehérállományi léziók kialakulását okozza. A 80%-nál nagyobb agyi vérátáramlás csökkenés

neuronpusztulást vált ki (Smith és mtsai. 1999). Az agyi vérátáramlás csökkenés intenzíven vizsgált terület az Alzheimer-kórral kapcsolatban. Agyi vérátáramlás csökkenés és/vagy diszreguláció tapasztalható az Alzheimer-kór kialakulása által leginkább veszélyeztetett idős egyéneknél, ami már jóval a kognitív károsodás és A $\beta$  akkumuláció előtt detektálható (Smith és mtsai. 1999, Bookheimer és mtsai. 2000). Neurológiailag egészséges egyéneknél az életkor előre haladtával növekvő vaszkuláris permeabilitás figyelhető meg (Farrall és Wardlaw 2009). Vaszkuláris demenciában, Alzheimer-kórban és ischémiás agyi kisérbetegségben szenvedő betegeknél nagyobb vaszkuláris permeabilitás fokozódást mutattak ki egészséges idős egyénekhez képest (Farrall és Wardlaw 2009). Alzheimer-kóros betegeknél a piális és intracerebrális erekben A $\beta$  halmozódik fel, ami cerebrális amiloid angiopathiát okoz. A cerebrális amiloid angiopathia az Alzheimeres betegek 80%-ánál jelentkezik (Jellinger 2010). Kimutatták, hogy igazolt cerebrális amiloid angiopathiával rendelkező Alzheimer-kóros betegek kis artériáiban és arterioláiban a vaszkuláris simaizomsejtek atrófiásak, ezért az erek fala könnyen megrepedhet és intracerebrális vérzés alakulhat ki. Ez az esetek 30%-ában elő is fordul, és jellemzően hozzájárul a demencia kialakulásához, illetve súlyosítja azt (Cordonnier 2011). APP mutációt hordozó egyéneknél a cerebrális amiloid angiopathia sokkal súlyosabb, ezért gyakran okoz haemorrhagiás vérzést (Rovelet-Lecrux és mtsai. 2006). Demenciás betegeknél a sejtek glükóz felvétele a normálisnál alacsonyabb, ami a Glut1 csökkent expressziójával is társulhat (Zlokovic 2011). Az A $\beta$  vazokonstriktor hatással is rendelkezik, ami hozzájárul Alzheimer-kóros betegeknél megfigyelhető csökkent hiperaemia kialakulásához. A vaszkuláris simaizomsejtek is támogatják ezt a folyamatot azáltal, hogy hiperkontraktilis fenotípust mutatnak magas cerebrovaszkuláris szérumválaszfaktor (SRF) és myocardin (MYOCD) hatására (Zlokovic 2011). Igazolták, hogy a P-gp (ABCB1) expressziója az életkorral fokozatosan csökken, a káros anyagok eltávolítása az agyból így folyamatosan lassul (Bartels és mtsai. 2009). Hipoperfúzió és hipoxia hatására a parenchimális erekben, astrocytáknál, és az intrathecalis térben a vaszkuláris eredetű növekedési faktor (VEGF) expressziója megemelkedik Alzheimer-kóros betegeknél. Az agyi mikroerek ezen kívül egyéb angiogén hatású anyagot (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF, MCP1, trombin, ANG2, HIF-1 $\alpha$ ) termelnek (Grammas 2011). Ezek az eredmények egyelőre szemben állnak minden eddigi tapasztalattal, mert eddigig senki sem mutatott ki fokozott vaszkularitást Alzheimer-kór esetén. Ennek oka talán abban keresendő, hogy az A $\beta$  jelentős antiangiogén hatással is bír. A hipovaszkularitás mellett szól az is, hogy Alzheimer-kóros betegek endotélsejtjeiben extrém alacsony mezenchimális homeobox fehérje

2 (MEOX2) expressziót tapasztaltak, ami felelős lehet a hipoxiára és VEGF-ra adott hibás angiogén válaszáért és a kapillárisok regressziójáért (Wu és mtsai. 2005).

Humán demens betegeken és állatmodelleken végzett vizsgálatok a következőkre mutattak rá (Zlokovic 2011): Hipoxia hatására glutaminsav excitotoxicitás lép fel, ezzel egy időben a glutaminsav astrocyták általi visszavétele is csökken. A Tau-fehéjék hiperfoszforilálódnak, fokozódik az A $\beta$  termelődés és oligomerizáció, ezzel párhuzamosan a neprilysin termelődés pedig csökken. A MEOX2 expresszió jelentős csökkenést mutat endothelben, míg a vaszkuláris simaizomsejtekben MYOCD expresszió növekedés tapasztalható. A mitokondriális ROS termelődés nő, ami központi szerepet tölt be a HIF-1 $\alpha$  regulációja alá tartozó szignálutak (túlélés, adaptáció, sejtciklus, apoptózis) szabályozásában. Cerebrovaszkuláris károsodás hatására az endothelsejtek metabolizmusa megváltozik, számos neurotoxikus (trombin) és gyulladásos faktort (NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), kemokint (MCP1, IL-8), prosztaglandinokat, mátrix metalloproteázokat, leukocita adhézións molekulákat termelnek.

## 2. Célkitűzés

Az utóbbi évtizedekben nagy hangsúlyt kaptak a neurodegeneratív betegségekre fókuszáló kutatások. Az átlagéletkor növekedése az időskori demenciák széles skálájának megjelenését eredményezte. A kognitív funkciók hanyatlásával járó kórképek közül leggyakoribb az Alzheimer-kór, amely az esetek mintegy 75-80%-át teszi ki. Az esetek további 15-20%-ban a demencia vaszkuláris eredetre vezethető vissza. A demenciák kialakulásában a cerebrovaszkuláris rendszer diszfunkciója, valamint a hiperlipidémia egyaránt fontos tényezők. Klinikai megfigyelések támasztják alá, hogy a hiperlipidémia és a következtében kialakuló cerebrovaszkuláris elváltozások neurodegeneratív folyamatokhoz vezetnek.

Kísérleteink során a hApoB-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset használtuk, amelyet korábban laboratóriumunkban állítottak elő (Bjelik és mtsai. 2006). Kimutatták, hogy a transzgenikus állatok normál tápon tartva magas szérumtriglicerid-szinttel, koleszterindús tápon tartva magas szérumkoleszterin-szinttel rendelkeznek (Csont és mtsai. 2007). Ez az egértörzs zsírdús tápon tartva az atherosclerosis egyik validált állatmodellje. A transzgenikus állatokban, mesterséges ischémia hatására, az agyi mikroerek denzitásának nagymértékű csökkenése, illetve ezt kompenzáló a kapillárisok átmérőjének növekedése tapasztalható (Süle és mtsai. 2009). A hat hónapos transzgenikus állatok agykérgében és hippocampusában kiterjedt neuronális apoptózis, illetve ennek következtében az agykamrák erőteljes tágulata figyelhető meg (Bereczki és mtsai. 2008).

Ezek ismeretében célunk a hiperlipidémia és a neurodegeneráció közötti kapcsolat vizsgálata volt hiperlipidemiás transzgenikus egerekben. Feltételezésünk szerint a tartós hiperlipidémia nem csak a kardiovaszkuláris, hanem a cerebrovaszkuláris rendszert is érinti, ott is érkárosodásokat indukál. Az endothel károsodás következtében fellépő szöveti hipoperfúzió és ischemia oxidatív stresszt okoz, ami a vér-agy gát integritásának sérüléséhez vezet. Ezek az elváltozások a neurodegeneratív folyamatok elindításának vagy felgyorsításának irányába hatnak, amik szinaptikus és neuronális diszfunkcióban, végül neuronális apoptózisban manifesztálódnak.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen hatással van a krónikus hipertrigliceridémia az agyi lipidmetabolizmusra?
2. Mik a hiperlipidémia következtében kialakuló neurodegeneratív elváltozások főbb jellemzői?
3. Milyen hatása van a hiperlipidémiának a vér-agy gát funkcióra?
4. Hogyan modellezhetjük a hiperlipidémia hatására *in vivo* kialakult endothel diszfunkciót *in vitro* a vér-agy gát izolált primer sejttypusain (endothel, astrocyta, pericyta)?

A tervezett kísérletek kivitelezését több kutatócsoporttal együttműködve valósítottuk meg:

A neurodegeneratív elváltozások morfológiai vizsgálatában, valamint az elektrofiziológiai mérések elvégzésében prof. Penke Botond, dr. Szegedi Viktor és a Neurodegeneratív betegségek kutatólaboratóriumának munkatársai (SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) nyújtottak segítséget.

A vér-agy gát funkcionális vizsgálatában és a vér-agy gát sejtjeivel való *in vitro* munkákban dr. Deli Mária és a Biológiai barrierék kutatócsoport (MTA SZBK Biofizika Intézet) együttműködését kértük.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 1. Milyen hatással van a krónikus hipertrigliceridémia az agyi lipidmetabolizmusra?

##### 3.1. Kísérleti állatok

Vizsgálataink során a saját laborunkban korábban előállított a hApoB-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset használtuk (Bjelik és mtsai. 2006). Ezzel a lipidtranszportban és lipidmetabolizmusban meghatározó szerepet játszó fehérjék arányának mesterséges megváltoztatása révén olyan, a lipidanyagcsere szempontjából „humanizált” egereket hoztunk létre, amelyek a humán atherosclerosis modellezésére alkalmasak. A törzs C57BL/6/J háttéren, heterozigóta formában hordozza a transzgént. Vad típusú kontrollnak ezért a transzgént nem hordozó alomtársakat használtuk az egyes vizsgálatok során. Az F1 (B6CBAF1/J) hibrid (C57BL/6J x CBA/J) petesejt donoroktól származó transzgenikus utódokat hatszor kereszteztük vissza a C57BL/6J törzsszel, hogy az összehasonlító kísérletekhez minél homogénebb genetikai hátteret biztosítsunk. Megállapítottuk, hogy a létrehozott transzgenikus egértörzs a májban, a szívben, az aortában és a szérumban termeli túl (2. függelék) a humán ApoB-100 fehérjét (Bereczki és mtsai. 2008). Megfigyeltük, hogy a transzgén hatására atherosclerosis 6 hónapos korra alakul ki, ezért vizsgálatainkat ehhez a korcsoporthoz igazítottuk, illetve konzekvensen ügyeltünk arra, hogy az állatok minimum 6 hónaposak legyenek. Az IHC, illetve Kongó vörös festéshez pozitív kontrollként AD (APPswexPSEN1dE9 kettős {Jackson Laboratory, stock number: 004462}) transzgenikus egereket használtunk.

Kísérleteink során az állatokat állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21 C° tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és normál rágcsálótáp) tartottuk.

Az egyes vizsgálatok során alkalmazott állatcsoportok (nem: hímek, nőstények vegyesen, életkor) és kezelések:

VIZSGÁLATI MÓDSZER	GENOTÍPUS	ELEMSZÁM	KEZELÉS
szérumtriglicerid mérés	Wt/Tg 3 hón	N=6-6	-
	Wt/Tg 9 hón	N=7-7	-

Nile red festés	Wt/Tg 10 hón	N=3-3	-
Filipin festés	Wt/Tg 14 hón	N=3-3	-
IHC	Wt/Tg 6 hón	N=3-3	-
	AD Tg 6 hón	N=1	-
Kongó vörös	Wt/Tg 6 hón	N=3-3	-
	AD Tg 6 hón	N=1	-
western blot	Wt/Tg 3 hón	N=3-3	-
	Wt/Tg 6 hón	N=3-3	-
kvant. western blot	Wt/Tg 6 hón	N=3-3	-
Golgi impregnáció	Wt/Tg 6hón	N=5-5	-
Fluoro-Jade C	Wt/Tg 6 hón	N=6-6	-
Elektrofiziológia	Wt/Tg 3 hón	N=6-6	-
	Wt/Tg 6 hón	N=6-6	-
kortikális mikroér génexpresszió	Wt/Tg 14-15 hón	N=6-6	61% lipid
in vivo vér-agy gát funkció			tartalmú diéta
			4 hétig
astrocyta izolálás	Wt/Tg 2 nap	N=4-4	-
VIZSGÁLATI MÓDSZER	GENOTÍPUS	ELEMSZÁM	KEZELÉS

### 3.2. A genomi DNS izolálása

Az újszülött egerek genotipizálása farokmintából izolált DNS-ből történt a következőképpen: 10 napos újszülött egerek farkából kb. 0,5 cm-es darabot vágunk, amit O/N 55 C°-on emésztettünk 200 ul TNES-t (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0, 0,6% SDS) és 10 ul proteináz K-t (20 mg/ml) tartalmazó oldatban. Másnap 55 ul túltelített NaCl oldattal folytattuk a minta feltárását, majd 10 perc centrifugálás (13000 rpm) után a felülúszót egy tiszta eppendorf csőbe mértük át, amiből 1V (210 ul) kloroformmal kicsaptuk a fehérjéket és a lipideket. Újabb 10 perces centrifugálás (13000 rpm) után a felülúszót ismét egy tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk át, amiből a DNS-t 1V (210 ul) jéghideg, abszolút etanollal kicsaptuk; majd 30 perces 4 C°-os (13000 rpm) centrifugálással kiülepítettünk. A képződött DNS pelletet 500 ul 70%-os etanollal mostuk, majd 5 perc (13000 rpm) centrifugálás után az etanolt eltávolítottuk, és a pelletet szobahőmérsékleten szárítottuk. A DNS-t ezután 1 órán át 65 C°-on oldottuk vissza 50-100 ul 10 mM Tris-HCl-ben (pH 7,4). Koncentrációjukat és tisztaságukat (OD<sub>260/280</sub>)



spektrofotométerrel (Thermo Scientific Nanodrop ND1000) határoztuk meg. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

### 3.3. Genotipizálás PCR-val

Az újszülött állatok genotipizálásához egy a humán gén promóter régiójára tervezett primer párt használtunk (*APOB* forward: 5'-AGAAGGTTCCAGATGTCTATGAGG-3'; *APOB* reverse: 5'-TCCAAGTATCTGTCTTCAAGAAACC-3'), hogy elkerüljük az endogén gén amplifikációját. A reakciókat 25 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint: 10 µl templát DNS (400 ng) és 15 µl PCR reakció mix (6,5 µl steril, szűrt MQ; 2,5 µl 10 x NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> puffer, 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 100 pmol/µl forward primer, 0,5 µl 100 pmol/µl reverse primer, 2,5 µl 2mM dNTP, 0,5 µl 5u/µl Taq polimeráz). A reakciókat MJ PTC-200 típusú PCR gépben futtattuk a következő programot alkalmazva: 95 °C-5 perc enzimaktiváció, 95 °C-1 perc denaturáció, 56 °C-40 másodperc hibridizáció, 72 °C-1 perc polimerizáció, 72 °C-4 perc utópolimerizáció (final extension), utóbbi három lépést 35 cikluson át ismételve. A PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen szeparáltuk és Et-Br-festéssel tettük láthatóvá.

### 3.4. Szérumtriglicerid-szint meghatározás

Az egerek szérumlipid-profilját kolorimetriás szérumtriglicerid méréssel vizsgáltuk. Fiatal (3 hónapos, N=6) és korosodó (9 hónapos, N=7) vad típusú (Wt), illetve transzgenikus (Tg) állatok farokvénájából vért gyűjtöttünk, amelyet 1,5 órán keresztül 37 °C-on, majd O/N 4 °C-on inkubálva megalvasztottunk. Másnap az alvadékat 15 percig, 4 °C-on (2000 x g) centrifugáltuk, majd a tiszta, hemolízismentes felülúszót (szérumot) egy tiszta eppendorf csőbe mértük és felhasználásig -80°C-on tároltuk. A szérumok trigliceridtartalmát enzimátikus kolorimetriás teszttel (Triglicerid ADPS stabil reagens, Diagnosticum Zrt.) határoztuk meg lipid standardokat is felhasználva. Mintánként 3 párhuzamos mérést végeztünk plate readerrel (Thermo Scientific Multiskan FC) 546nm-en. A mért értékeket mmol/l egységben adtuk meg. A statisztikai elemzést kétszemponos ANOVA-val, Bonferroni poszt-hoc teszttel végeztük. Az értékeket p<0,05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

### 3.5. Nílus vörös festés

Azért, hogy a cerebrális trigliceridszintről is információt gyűjtsünk, agyszöveten Nílus vörös festést végeztünk. Korosodó (10 hónapos) állatok (Wt és Tg, N=3-3) agyát transzkardiális perfúziót (PBS) követően eltávolítottuk, majd natívan O.C.T. (Sakura Tissue-Tek) médiumba ágyztuk. Kriomikrotómmal (Thermo Scientific, FSE) 10  $\mu$ m vastag szagittális metszeteket készítettünk, amelyeket 1 percig acetonban fixáltunk, majd 3 x 3 percig PBS-ben mostunk. A festéshez (Fowler és mtsai. 1985, Greenspan és mtsai. 1985 alapján) 0,5 mg/ml acetonos Nílus vörös (Fluka) törzsoldatot készítettünk, amelyet 75%-os glicerinnel 4  $\mu$ l/ml-re hígítottunk, majd frissen vákuumszűrtünk. E koncentrációval sötétben 1 óráig festettük a metszeteket (100  $\mu$ l/minta). A felesleges festéket 3 x 3 perces PBS-es mosással távolítottuk el. A sejtmagokat DAPI-festéssel (Sigma) tettük láthatóvá. A kész metszeteket glicerines PBS-el fedtük le. Az aranyárga fluoreszcens jelet 530 nm-en, a piros jelet 560 nm-en detektáltuk fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse E600). A különböző hullámhosszoknak köszönhetően az egyes lipid típusok jól elkülönülnek: a neutrális lipidek sárga színnel, míg a foszfolipidek és egyéb amfipatikus lipidek (koleszterin, glikolipidek, zsírsavak) piros színnel jelennek meg (Amharref és mtsai. 2007, Ranall és mtsai. 2011). A mikroszkópos felvételeket SPOT Advanced 4.6 verziójú kamera program segítségével értékeltük.

### 3.6. Filipin festés

A trigliceridszint mellett kíváncsiak voltunk arra is, hogyan alakul a koleszterin mennyisége az agyban, ezért agyszöveten Filipin festést végeztünk. Korosodó (14 hónapos) állatok (Wt és Tg, N= 3-3) agyát transzkardiális perfúziót (4% PFA- PBS) követően eltávolítottuk, majd további 1 óráig 4% PFA- PBS oldatban fixáltuk. Ezt követően O.C.T. (Sakura Tissue-Tek) médiumba ágyztuk és kriomikrotómmal (Thermo Scientific, FSE) 10  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket 2 x 5 percig PBS-ben mostuk, majd a formaldehidet 10 perces 1,5 mg/ml Gly- PBS-es mosással semlegesítettük. A festést (Gondré-Lewis és mtsai. 2003. alapján) 0,5 mg/ml Filipin- PBS-sel (100  $\mu$ l/minta, Sigma) végeztük 2 órán át, sötétben. A felesleges festéket 2 x 5 perc PBS-es mosással távolítottuk el. A sejtmagokat propídium-jodiddal (Sigma) tettük láthatóvá. A kék fluoreszcens jelet 380 nm-en fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse E600) detektáltuk. A mikroszkópos felvételeket SPOT Advanced 4.6 verziójú kamera program segítségével értékeltük.

### 3.7. Immunhisztokémia

A cerebrális lipoproteinek, receptoraik,  $\beta$ -amiloid plakkok és foszforilált Tau-fehérjék szöveti mintázatának vizsgálatára agyszöveten peroxidázos immunhisztokémiát végeztünk. Felnőtt (6 hónapos) állatok (Wt és Tg, N=3-3) agymintáit natívan O.C.T. (Sakura Tissue-Tek) médiumba ágyasztuk, majd kriomikrotómmal (Thermo Scientific, FSE) 10  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk belőlük, amiket 3 percig acetonban fixáltunk. Mintáinkban hApoB-100-at (Millipore), ApoE-t (Santa Cruz Biotechnology),  $A\beta_{1-40/42}$ -t (Millipore), illetve TaupSer<sup>404</sup>-et (Invitrogen) jelöltünk HRP konjugált, poliklonális ellenanyagokat használva. A következő protokoll szerint jártunk el: 5 perc PBS-es mosást követően 2 x 20 percig 60 ml (2 x 3ml) 30%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó metanolban blokkoltuk az endogén peroxidázokat. Majd 2 x 5 perces PBS-es mosást követően 10 percig 0,1 mg/ml I-es típusú kollagenázzal (Sigma) tártuk fel a mintákat (100  $\mu$ l/minta). Újabb 2 x 5 perces PBS-es mosást követően 1 óráig 5%-os nyúl illetve kecske szérummal blokkoltuk a mintákat (100  $\mu$ l/minta) szobahőmérsékleten. Ezután O/N 4 C°-on inkubáltuk a mintákat az elsődleges ellenanyagokkal (50  $\mu$ l/minta, hApoB-100: 1:100, ApoE: 1:100,  $A\beta_{1-40/42}$ : 1:200, TaupSer<sup>404</sup>: 1:200). Másnap 3 x 5 perces PBS-es mosást követően 45 percig inkubáltuk a mintákat a másodlagos ellenanyagokkal (50  $\mu$ l/minta, nyúl anti-kecske: 1:250, kecske anti-nyúl: 1:800, Jackson Immuno Research) szobahőmérsékleten. Újabb 3 x 5 perc PBS-es mosás után a metszeteket 5-10 percre előhívó reagensbe helyeztük (5 ml N, N-dimetil-formamid, 5 ml 10x imidazol puffer, UP víz, 20  $\mu$ l 30%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mg AEC [3-Amino-9-etil-karbazol] szubsztrát). A barna csapadék megjelenése után 2 x 5 perc PBS-es mosással eltávolítottuk a felesleges hívó folyadékot a mintákról, majd 3 percig Mayer-féle hematoxilinnel magfestést végeztünk. A kész metszeteket glicerines zselatinnal (Merck) fedtük le és fénymikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon Eclipse E600). A mikroszkópos felvételeket SPOT Advanced 4.6 verziójú kamera programmal értékeltük.

### *2. Mik a hiperlipidémia következtében kialakuló neurodegeneratív elváltozások főbb jellemzői?*

### 3.8. Alkalikus Kongó vörös festés

Az amiloid plakkok detektálásának egyszerű és gyors módját választva, agyszöveten Kongó vörös festést végeztünk. Felnőtt (6 hónapos) egerek (Wt és Tg, N=3-3) agymintáit natívan O.C.T. (Sakura Tissue-Tek) médiumba ágyasztuk, amelyből kriomikrotómmal

(Thermo Scientific, FSE) 10  $\mu$ m vastag szagittális metszeteket készítettünk, amiket 3 percig acetonban fixáltunk. A metszeteket 0,5 ml 1%-os NaOH-ot tartalmazó Kongó vörös (Sigma) oldatban (0,3 g Kongó vörös, 0,3 g NaCl, 100 ml 80%-os etanolban) festettük 20 percig. A lemezeket ezután 2 x 5 percig UP vízzel mostuk, majd a sejtmagokat 10 percig Mayer-féle hematoxilinnel festettük. Újabb 2 x 5 perces UP vizes mosást követően a mintákat glicerines zselatinnal (Merck) fedtük le, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk (Nikon Eclipse E600). A mikroszkópos felvételeket SPOT Advanced 4.6 verziójú kamera programmal értékeltük.

### 3.9. Western blot

A cerebrális lipoproteinek, receptoraik,  $\beta$ -amiloid és foszforilált Tau-fehérje szöveti mintázata mellett kíváncsiak voltunk e fehérjék Wt-hoz viszonyított relatív expressziójára is, ezért agyszöveten western blottal vizsgáldtunk. Felnőtt (6 hónapos) és fiatal (3 hónapos) állatok (Wt és Tg, N=3-3) agymintáiból cortexet preparáltunk, amiből RIPA pufferrel (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 8.0) fehérjét izoláltunk. Az izoláló puffer ml-ként 20-20  $\mu$ l proteáz inhibitor (12 mg/ml NEM: N-etil-maleimid, 17 mg/ml PMSF: Fenil-metánszulfonil-fluorid, Sigma) tartalmazott. A homogenátumot 30 percig 4  $^{\circ}$ C-on centrifugáltuk (10000 x g), majd a felülúszó fehérje tartalmát 280 nm-en spektrofotométerrel (Thermo Scientific Nanodrop ND1000) ellenőriztük. A mintákat 4x mintapufferrel (0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 40% glicerol, 20%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,05% brómfenol kék, 8% SDS) egységesen 5  $\mu$ g/ $\mu$ l-re hígítottuk, majd 5 percig 95  $^{\circ}$ C-on denaturáltuk. Ezután 50-50  $\mu$ g fehérjét denaturáló poliakrilamid gélre vittünk fel, majd a fehérjéket félszáraz módon PVDF membránra transzferáltuk. A membránt ezután 5% sovány tejport, illetve 3% BSA-t (Cohn frakció V., Santa Cruz Biotechnology) tartalmazó PBST-vel (1,5% Tween-20- PBS) blokkoltuk 1 óráig szobahőmérsékleten. Éjszakára hApoB-100 (Chemicon Int., 1:500), ApoA-I (Rockland, 1:500), LDLr (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), ApoE (Santa Cruz Biotechnology, 1:100),  $\beta$ -aktin (Sigma, 50ng/ml), TaupSer<sup>199/202</sup> (Invitrogen, 1:500), TaupSer<sup>262</sup> (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), TaupSer<sup>396</sup> (Invitrogen, 1:1000), TaupSer<sup>404</sup> (Invitrogen 1:3000), TauV-20 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), illetve APP N-terminális (Chemicon Int, 1:1000) poliklonális ellenanyaggal jelöltük. Másnap 3 x 15 perces mosást követően 45-60 percig a megfelelő másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (kecske anti-nyúl, nyúl anti-kecske 1:20000-1:50000, Jackson Immuno Research) szobahőmérsékleten, majd a fehérjéket chemilumineszcens HRP (HRP: horseradish peroxidase) szubsztráttal (Millipore Luminata Forte) röntgenfilmen detektáltuk. A röntgenfilmek denzitometrálását Image J

program segítségével végeztük. A statisztikai elemzéshez egymintás T-próbát használtunk. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### 3.10. Kvantitatív western blot

A Tau-fehérje és a fehérje kináz C-gamma (PKC- $\gamma$ ) hiperfoszforilált formáinak kvantitatív vizsgálatára immunoblottos analízist készítettünk. Felnőtt (6 hónapos) állatokból (Wt és Tg, N=3-3) származó kortikális szövetmintákat küldtünk immunoblottos foszforilációs-profil vizsgálat céljából (Kinetworks<sup>TM</sup> Immunoblotting Phosphosite Profiling) a kanadai Kinexus Bioinformatics Corporation céghez (<http://www.kinexus.ca/>). A szolgáltatás keretében a Tau- és PKC- $\gamma$  fehérje foszforilációs helyeit vizsgálták több különböző gyártótól származó foszforilációs hely specifikus ellenanyaggal 500 ug szövet lizátumból. Összesen 14, targetenként 3-4 ellenanyaggal vizsgálták a foszforilációs helyek foszforiláltsági szintjét (TauSer<sup>199</sup>, Ser<sup>199/202</sup>, Ser<sup>396</sup>, Ser<sup>404</sup>, PKC- $\gamma$  Thr<sup>514</sup>, Thr<sup>655</sup> és Thr<sup>674</sup>). A fehérje sávokat chemilumineszcensen (Bio-Rad FluorSMax Multi-imager) detektálták, majd a kapott jeleket egységnyi időre normalizálták (1 perc) és percenként detektált fényfelvillanásban (cpm: counts per minute) fejezték ki (Pelech és mtsai. 2003). A Wt állatokban tapasztalt értékeket 100%-nak véve adtuk meg a pPKC- $\gamma$  és pTau cpm értékeit. Mivel a vizsgálatokat genotípusonként egyesített mintákon végezték, ezért az ábrákon SD-öt nem tudunk feltüntetni.

### 3.11. Golgi-Cox ezüstimpregnáció

A dendrittüske-sűrűség meghatározásához és összehasonlító elemzéséhez ezüstimpregnációt végeztünk. Felnőtt (8 hónapos) állatokból (Tg és Wt, N=5-5) cervikális diszlokációt követően agyat preparáltunk, amelyet 10 mm-s darabokra vágunk majd A és B oldat egyenlő arányú keverékében 3 hétig (az oldatokat időnként lecserélve) sötétben fixáltunk. A mintákból vibratómmal (Microm HM 650V) 100 um vastag metszeteket készítettünk (zselatinos tárgylemezen), amelyeket 24 óra száradást követően az FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies) instrukcióit követve festettünk meg. A metszeteket 4 perc desztillált vizes mosást követően 10 percig D, E oldat és víz 1:1:2 arányú keverékében inkubáltuk, majd újabb 8 percig desztillált vízben mostuk. Ezt követően 4-4 percig felszálló alkoholsort (50%-os, 75%-os, 95%-os etanol) alkalmaztunk, végül 16 percig abszolút etanolban, illetve 12 percig xilolban áztattuk a metszeteket. A tárgylemezeket DPX (Fluka) médiummal fedtük le. A mintákat fénymikroszkóppal (Zeiss Observer Z1) 1000x nagyításon

vizsgáltuk. Felvételeket a hippocampus CA1 régió stratum radiatum neuronjainak a szómától legalább 100  $\mu\text{m}$  távolságra lévő, 100  $\mu\text{m}$  hosszú apikális dendrit szakaszairól készítettünk, állatonként 5 agyszeletről, szeletenként 5 sejtről (AxioCam MRV3 kamerát és AxioVision 40V.4.8.1.0 programot használva). A dendrittüske-sűrűséget (darabszámban) a készített képek alapján Image J szoftver segítségével határoztuk meg. Az adatok statisztikai kiértékeléséhez egymintás T-próbát-t használtunk. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### 3.12. Fluoro-Jade C festés

Az elpusztult neuronok számának kvantitatív összehasonlításához agyszöveten Fluoro-Jade C festést végeztünk.-A festéshez felnőtt (6 hónapos) állatok (Wt és Tg, N=6-6) natív agymintáiból kriomikrotómmal (Thermo Scientific, FSE) 10  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk, amiket 3 percig acetonban fixáltunk. A lemezeket ezután 5 percre abszolút etanolba, majd 2 percre 70%-os etanolba, illetve 2 percre 30%-os etanolba helyeztük. A leszálló alkoholsor után 2 percig UP vízben hidratáltuk a metszeteket, majd 30 percig 0,06%-os kálium-permanganát ( $\text{KMnO}_4$ ) oldatban (UP vizes), fénytől védve inkubáltuk a lemezeket. Ezt követően UP vízben 2 x 2 percig mostuk őket. A következő lépésben 30 percig fénytől védve, 0,0004% Fluoro-Jade C (Millipore) oldatban (4 ml 0,01% Fluoro-Jade C törzsoldat [UP vizes], 96 ml UP víz, 96  $\mu\text{l}$  cc. ecetsav) festettük őket. A felesleges festéket 3 x 2 perces UP vizes mosással távolítottuk el, majd 2 percig xilollal öblítettük át a metszeteket végül DPX-el (Fluka) fedtük le őket. A metszeteket festés után fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse E600) ex. 485 nm/em. 525 nm-en vizsgáltuk és SPOT kamera segítségével állatonként 5-5 fotót készítettünk (20x nagyítás) a cortexről és a hippocampusról. A detektált fluoreszcens jeleket megszámloltuk, majd elpusztult sejtszám/látómező egységben fejeztük ki. A fluoreszcens festődést csak abban az esetben tekintettük számolható jelnek, ha egyértelmű volt azok sejtmaghoz tartozása. Az adatok statisztikai értékelésére egymintás T-próbát végeztünk. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### 3.13. Elektrofiziológiai mérések előkészítése

A fent részletezett módszerekkel detektált neurodegeneratív elváltozások funkcionális következményeinek vizsgálatára dr. Szegedi Viktor és munkatársai elektrofiziológia méréseket végeztek nekünk. Fiatal (3 hónapos) és felnőtt (6 hónapos) állatok (Wt és Tg, N=6-6) hippocampusából 350  $\mu\text{m}$  vastag túlélő szeleteket készítettek (McIlwain tissue chopper, Campden Instruments), amelyeket 60 percig mesterséges cerebrospinális folyadékban (130

mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,96 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM D-glükóz, pH 7.4) inkubáltak szobahőmérsékleten, miközben 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> keverékével folyamatosan átbuborékolatták. Az egyes szeleteket egy 60db, egymástól 200 um távolságra elhelyezkedő, 60 um magas tüelektrodát tartalmazó 3D-MEA chipre (Ayanda Biosystems) helyezték. A szövetet egy fémhálóval rögzítették, majd a mérés során 34 C°-os oxigenizált mesterséges cerebrospinális folyadékot áramoltattak át rajta 1,5 ml/perc sebességgel. Az adatokat standard MEA készülékkel (Multi Channel Systems, MCSGmbH) rögzítették.

### 3.14. Ingerlési protokoll

Egy kiválasztott elektródon keresztül bifázisos (2100/+100 ms), 0,033 Hz-es áramimpulzussal ingerelték a Schaffer-kollaterálist. A mérés során mindig gondosan ügyeltek arra, hogy szeletről szeletre mindig ugyanazon helyre pozícionálják az ingerlő elektródot. A kiváltott serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálokat (fEPSP) a hippocampus CA1 régiójából (stratum pyramidale, stratum radiatum) vezették el. 30 perc inkubációs periódust követően meghatározták a kiváltott potenciálok küszöb és maximális intenzitás (amplitúdó) értékeit. A válaszok provokálásához a továbbiakban a maximális intenzitás érték 30%-át kiváltó impulzusokat alkalmaztak. Stabil 10 perces kontroll szakasz felvétele után a páros pulzus facilitációs protokollt (PPF) alkalmazták. Röviden, ha egy preszinaptikus neuron gyors egymásutánban két stimulust kap, akkor a második stimulusra adott válasz nagyobb lesz, mint az elsőre adott. Így két 0,033 Hz-es ingerlő impulzust alkalmaztak egymás után 50, 100 illetve 200 ms-os szünetekkel (interstimulus-intervallum), amelyekben egyenként 3-3 adatpontot rögzítettek. Kiértékelés során a két válasz amplitúdójának arányát vizsgálták.

### 3.15. LTP és depotencírozási protokoll

10 perces stabil kontroll szakasz felvétele után theta-burst stimulációval (TBS) maximális intenzitású hosszú távú szinaptikus hatékonyság fokozódást (LTP) váltottak ki. A TBS protokoll 4 ingerlő impulzussorozatból állt 20 s-os inter-burst-intervallumokkal. Sorozatonként 10 5 Hz-es ingerlő impulzust adtak, majd további 4 nagy frekvenciás (100 Hz) impulzussal (HFS) LTP-t váltottak ki. Az ily módon kiváltott LTP-t 60 percig regisztrálták, majd 5 perces alacsony frekvenciás (3 Hz) ingerléssel (LFS) depotencírozódást váltottak ki, amelyet 30 percig regisztráltak.

### 3. Milyen hatása van a hiperlipidémiának a vér-agy gát funkcióra?

#### 3.16. *In vivo* vér-agy gát funkció vizsgálat

A tapasztalt neurodegeneratív elváltozások kiterjedtségének megállapítására a vér-agy gát funkcionális érintettségét vizsgáltuk. Korosodó (14-15 hónapos) állatokból (Wt és Tg) normál és zsír dús tápon (RM AFE 61% FAT SY (M), Special Diet Services) tartott csoportokat (Wt normál táp, Tg normál táp, Wt zsírdús táp, Tg zsírdús táp) alakítottunk ki (N=6 minden csoportban). Az etetést 4 héten keresztül végeztük 61%-os zsírtartalmú táppal (disznózsír, kazein, dextróz, szukróz, DL-metionin, kolin, klorid, vitamin mix, ásványi mix). Ezután *in vivo* kísérletben 5 ml/ttkg dózisban i.v. 2%-os Na-fluoreszcein-Evans-kék oldattal kezeltük az állatokat, amelyet 1 óráig hagytunk a keringésükben eloszlni. Ezt követően a szívekből vérmintákat gyűjtöttünk, majd gyors PBS-es transzkardiális perfúziót követően 5 agyterületet preparáltunk ki (cortex, cerebellum, nyúltvelő-híd, középagy, bulbus olfactorius). Ezen területek festék tartalmát *in vitro* fluorimetriásan mértük, majd tömegükre vonatkoztatva (mg festék/g agyterület) adtuk meg. Röviden: az agy és szérum mintákat 50% -os TCA-ban (triklórecetsav) homogenizáltuk, majd 12 percig 13000 rpm-mel 4 C°-on centrifugáltuk. A felülúszók (250 ul) Evans-kék tartalmát 2-2 párhuzamost használva plate readerrel (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech). 620 nm-en határoztuk meg. A felülúszók (700 ul) Na-fluoreszcein-tartalmát lúgos közegben (pH 8 felett) küvettában, PTI spektrofluoriméterrel (T-format, Quanta Master QM-1; Photon Technology Int.) 510 nm-en határoztuk meg. Az egyes agyterületek és a szérum festékkoncentrációinak arányából következtettünk a vér-agy gát funkcióra (Nakagawa és mtsai. 2009). Az adatok értékeléséhez kétszemponos ANOVA-t használtunk, amelyet Bonferroni poszt-hoc teszttel egészítettünk ki. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

Az etetéshez használt (RM- AFE 61% FAT SY (M)) táp összetétele:

ÖSSZETÉTEL	% (W/W)
disznózsír	31
nyers fehérje	17,96
hamu	3,38
szénhidrát	36
nyers rost	0,56
szója olaj	7%



### 3.17. Kortikális mikroerek izolálása

A hiperlipidémia vér-agy gátra gyakorolt hatását génexpresszió szintjén kortikális mikroér preparátumokon vizsgáltuk. Négy hétig zsírdús, illetve normál tápon tartott egerek (Wt és Tg, N=6-6) agyát dr. Deli Mária és munkatársai segítségével kipreparáltuk, amelyekről a kisagyat, szaglógumót és a középagyi területet leválasztottuk. Az agyhártyákat és a choroid plexust eltávolítottuk, majd 3 V jéghideg szukróz pufferben (1M szukróz, 1M HEPES) potterrel homogenizáltuk. A mielin réteget többszöri (10 perc, 1000 x g, 4 C°) centrifugálással távolítottuk el. Ezt követően a makro-, és mikroereket választottuk szét szukróz pufferben többszöri centrifugálással (1 perc 5 másodperc, 100 x g, 4 C°). Ily módon a teljes mikroér frakciót összegyűjtöttük, a visszamaradt pellet pedig a makroér frakciót tartalmazta. Az egyes frakciók tisztaságát az izolálás során fáziskontraszt mikroszkópiával határoztuk meg. A továbbiakban az összegyűjtött mikroér frakciókat centrifugálással (2 perc 15 másodperc, 200 x g, 4 C°) egyesítettük, majd szukróz pufferben kétszer, illetve PBS-ben egyszer mostuk, a mosások között pedig centrifugáltuk (2 perc 200 x g 4 C°). A pelletet az utolsó PBS-es mosást követően 10 percig 10000 x g-vel 4 C°-on centrifugáltuk, majd folyékony N<sub>2</sub>-ben lefagyasztottuk vagy felhasználásig Trizolban (Invitrogen) tároltuk. Mivel a mikroerek az agy térfogatának mindössze 2%-át teszik ki, így több állatból származó (N=2 x 3), egyesített mintákkal dolgoztunk. Az izolálás Tontsch és Bauer által leírt protokoll szerint (Tontsch és Bauer 1989) történt.

### 3.18. RNS izolálás mikroér frakcióból

A mikroér frakcióból NucleoSpin RNA II kittel (Macherey-Nagel), a gyártó által megadott protokollt követve totál RNS-t izoláltunk. Röviden, a szövetet lízis pufferben homogenizáltuk, majd a lizátumot szövetszűrő oszlopra vittük fel és centrifugáltuk. Ezt követően az RNS-t 70%-os etanollal kicsaptuk, majd szilika membránt tartalmazó oszlopra kötöttük. Sótalanítást követően rDNáz kezeltük, majd a membránról lemostuk és steril, RNáz-mentes vízben oldottuk vissza. Az RNS koncentrációt és tisztaságot (OD<sub>260/280</sub>) spektrofotométerrel (Thermo Scientific Nanodrop ND1000) határoztuk meg.

### 3.19. Reverz transzkripció és QPCR

3 µg mRNS-t írtunk át 120 µl térfogatban iScript cDNA synthesis kittel (Bio-Rad) a következők szerint: 24 µl 5x Reaction Mix, 6 µl iScript RTase, 3 µg (x µl) RNS, 120- (30 + x µl) RNáz-mentes víz. Az átírás MJ PTC-200 PCR gépben a következő protokoll szerint

történt: 5 perc 25 C°, 30 perc 42 C°, 5 perc 85 C°. Az átírt cDNS koncentrációját (OD<sub>260/280</sub>) spektrofotométerrel (Thermo Scientific Nanodrop ND1000) határoztuk meg.

Relatív génexpressziós vizsgálatainkhoz SYBR Green I alapú (FastStart SYBR Green Master 2x, Roche; Power SYBR Green PCR Master Mix 2x, Applied Biosystems) detektálási módszert alkalmaztunk. Az egyes reakciókat 20 µl térfogatban mértük össze a következőképpen: 10 µl 2x SYBR Green Master Mix, 1 µl 5pmol/µl primer (Bioneer, Microsynth) mix (fw + rev), 100 ng (~1 µl) cDNS templát, 8 µl steril MQ. A reakciókat Qiagen RotorGene készülékben (FastStart SYBR Green Master 2x-t használva) az alábbi kondíciók szerint futtattuk: denaturáció 95 C° 10 perc, majd 95 C° 15 másodperc, hibridizáció (annealing) 58-60 C° 45 másodperc, elongáció 72 C° 30 másodperc, mindezt 40 cikluson keresztül ismételve, végül pedig az olvadási görbe (melt curve) felvétele történt 50-95 C° között 0,5 C°-os emelkedéssel. Kontroll génként β-aktint, GAPDH-t és RPI13a-t használtunk. A vizsgált génekre specifikus primer szekvenciákat a 4. függelék tartalmazza)

A relatív génexpressziós változások (fold expression change) meghatározására a  $\Delta\Delta C_t$  módszert alkalmaztuk. Röviden, az egyes mintákat a saját kontroll génjükre normalizáltuk ( $C_{t\text{minta}} - C_{t\text{Kgén}} = \Delta C_t$ ), majd az így származtatott  $\Delta C_t$  értékekből  $\Delta\Delta C_t$  értékeket ( $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{Tg}} - \Delta C_{t\text{Wt}}$ ), illetve relatív expressziósszint-változást (fold expression change =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) számoltunk. A  $\Delta\Delta C_t$  értékeket log<sub>2</sub> skálán ábrázoltuk, overexpresszióknak az 1 és e feletti értékeket, represszióknak a -1, illetve az ez alatti értékeket tekintettük.

*4. Hogyan modellezhetjük a hiperlipidémia hatására in vivo kialakult endothel diszfunkciót in vitro a vér-agy gát izolált primer sejttypusain (endothel, astrocyta, pericyta)?*

### 3.20. Primer kapilláris endothelsejtek/pericyták izolálása

A vér-agy gát primer sejtjeinek oxLDL-lel szembeni érzékenységeinek vizsgálatához, dr. Deli Mária és munkatársai segítségével, izolált primer sejtekből tenyészeteket hoztunk létre, amihez a sejteket a következőképpen izoláltuk: Felnőtt (6-7 hónapos) állatok (N=12) agyát kipreparáltuk, amelyekről a kisagyat, szaglógumót és a középagyat leválasztottuk. Az agyhártyák és a choroid plexus eltávolítása után a mintákat szikével felaprítottuk, hogy az enzimatisz emésztéshez előkészítsük. A reakciót (13,5 ml magas glükóz tartalmú DMEM [Gibco], 1,5 ml 10 mg/ml kollagenáz II [Sigma], 200 µl 2000 U/ml DNáz I [Sigma]) 40 percig 37 C°-on rázatva inkubáltuk. Ezt követően 10 ml DMEM hozzáadása után

centrifugáltuk (8 perc, 1000 x g, 4 C°), majd a felülúszót eltávolítottuk és a pellethez 12 ml 20% BSA (Sigma)-DMEM-et adtunk. Újabb centrifugálást (20 perc, 1000 x g, 4 C°) követően a mielin réteget leszívtuk és a pelletet képező mikroereket DMEM-ben összegyűjtöttük. A mielines felülúszóval pedig még kétszer megismételtük az előbbi centrifugálási lépést, miközben a mikroér frakciót folyamatosan gyűjtöttük. Az ily módon összegyűjtött mikroér frakciót 30 percig, 37 C°-on rázatva emésztettük (9 ml DMEM, 1 ml 10 mg/ml kolleganáz/diszpáz (Roche), 100 ul 2000 U/ml DNáz I), majd újabb 10 ml DMEM hozzáadása után centrifugáltuk (7 perc, 700 x g, 4 C°). A felülúszót leszívtuk, és a sejteket 13 ml DMEM-el mostuk, majd centrifugáltuk (8 perc, 700 x g, 4C°) és a sejtszuspenziót 60 mm ø csészékbe osztottuk. Endothelsejtek izolálása esetén a tenyésztő médium (DMEM/F-12, 10 ul 100 ug/ml bFGF [Roche], 1ml 10 KU heparin [Sigma]) 15% PDS-t (Sigma) és 3 ug/ml puromicint (Sigma) is tartalmazott, amely 48-72 óra alatt szelektíven elpusztította a P-gp-t nem expresszáló sejteket (pericytákat). Az endothelsejtek számára a Petri-csészéket fibronectin (1 mg/ml, Sigma), IV típusú kollagén (1 mg/ml Sigma) és steril MQ 8:1:1 arányú keverékével vontuk be. A pericyták nem igényeltek speciális bevonást, tenyésztő médiumuk is egyszerűbb (magas glükóz tartalmú DMEM/F-12, 10% FBS [Sigma]).

### 3.21. Primer astrocyták izolálása

Dr. Deli Máriával és munkatársaival együttműködésében 1-2 napos újszülött állatok (Wt és Tg, N=4-4) agyát kipreparáltuk, majd a kisagyat és a szaglógumót leválasztottuk. Az agyhártya eltávolítása után a szövetet szikével apró darabokra vágtuk és 10 ml 10% FCS (Sigma)- DMEM-ben vettük fel, majd egy 40 um pórusméretű steril nylon hálón passzíroztuk keresztül. Az így nyert szövet homogenátumot 10% FCS-DMEM-ben mostuk át (5 perc, 4 C° 700 g centrifugálással), majd a sejtszuspenziót poli-L-lizinnel (5 ug/ml, Sigma) bevont flasksba osztottuk szét. Két nap elteltével, miután az astrocyták letapadtak, médiumot (magas glükóz tartalmú DMEM/F-12, 10% FBS) cseréltünk.

### 3.22. Immuncitokémia primer endothelsejteken, astrocytákon és pericytákon

Az izolált primer sejttypusok molekuláris fenotipizálására és az ApoB-100 fehérje detektálására a primer tenyészeteken dr. Deli Mária és munkatársai segítségével immuncitokémiát végeztünk. A festéshez a primer sejteket (50000 sejt/coverslip) 50 ul médiumban (endothel és pericyta esetén fibronectin, IV-es kollagén és MQ 8:1:1 arányú keverékével; astrocyta esetén poli-L-lizinnel bevont) coverslippekre szélesztettük, majd

miután letapadtak, további 450  $\mu$ l tenyésztő médiumot kaptak. Két napig hagytuk a sejteket proliferálni, majd többszöri PBS-es mosást követően 3% PFA- PBS (pH 7,4)-el 30 percig, 4 °C-on fixáltuk őket. A feltárást 15 percig 0,2% Triton X-100- PBS-el végeztük (4 °C-on). Háromszöri PBS-es mosás után a sejteket 1,5 óráig 5% -os rabbit szérummal (Sigma), illetve 3%-os BSA-PBS-sel szobahőmérsékleten blokkoltuk. Elsődleges ellenanyagokkal (hApoB-100 1:200, 5%-os nyúl szérummal, Cldn-5, ZO1,  $\beta$ -katenin 1:150, GFAP 1:200, 3%-os BSA-val) O/N 4°C-on inkubáltuk. Másnap háromszöri PBS-es mosást követően másodlagos ellenanyagokkal (nyúl anti-kecske A488 1:400, CY3 anti-nyúl 1:200) 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. Többszöri PBS-es mosást követően fluoreszcens mounting mediummal (Fluoromount-G, Southern Biotech) fedtük le a fedőlemezeket; amelyeket konfokális (Leica confocal LSM) mikroszkóppal értékeltünk. Az egyes festődések fluoreszcencia intenzitását ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. Az intenzitás értékeket egymintás T-próbával értékeltük, szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük. Az élő/elpusztult sejtek arányának meghatározásához kettős fluoreszcens sejtmagi jelölést alkalmaztunk: Hoechst (Sigma)–ethidium-homodimer-1 (Molecular Probes) festést. (A Hoechst az élő sejtek magját kékre, míg az ethidium-homodimer-1 az elpusztult sejtek magját pirosra festi.)

### 3.23. *In vitro* viabilitási/toxicitási tesztek primer sejteken

Primer endothelsejtek, astrocyták és pericyták növekedési kinetikáját, valamint oxidált LDL-el (oxLDL, Biomedical Technologies, Inc.) szembeni érzékenységet vizsgáltuk, dr. Deli Máriával és munkatársaival, valós idejű sejtanalizáló rendszerrel (ACEA Biosciences, Inc. xCELLigence RTCA-SP), valamint LDH (Cytotoxicity Detection kit [LDH], Roche) teszttel. Az általunk alkalmazott oxLDL humán plazmából tisztított, 3,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>-tal 24 óráig oxidált, 75,6 nmol MDA/mg fehérje TBARS (TBARS: thiobarbituric acid reactive substances) értékű volt. Az oxLDL kezelés hatására képződött intracelluláris ROS mennyiségét fluoreszcens indikátor (klorometil-dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát [CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes]) segítségével mértük. A mérésekhez a sejteket azonos sűrűségben 96-lyukú E-plateken (ACEA Biosciences, Inc.), illetve Assay plate-eken növesztettük, miközben a sejtek növekedési kinetikáját (xCELLigence rendszerrel) időben folyamatosan követtük. A stacioner fázist elérve mindhárom sejttípus azonos kezelésben részesült.

### 3.24. Valós idejű viabilitás vizsgálat (xCELLigence rendszerrel)

Dr. Deli Máriával és munkatársaival együttműködésben, alul integrált arany mikro-elektrodokat tartalmazó 96-lyukú plate-en (E-plate) növesztettük a sejteket, és közben impedancia méréssel időben folyamatosan (3-5 percenként) monitoroztuk a növekedésüket/elektromos rezisztenciájukat. Az impedancia mérés kvantitatív információt szolgáltat a sejtek biológiai állapotáról (sejtszám, viabilitás). A mérések segítségével a sejtek növekedési kinetikája, kezelőszerekre adott válasza folyamatosan követhető. Az impedancia értékekből a készülék úgynevezett sejt indexet (CI), azaz relatív impedancia változást, származtat. Értékelés során normalizált CI-ekkel dolgoztunk, vagyis a kezelés előtt mért impedancia értékhez képesti rezisztencia-változásokkal.

A sejteket az egyes lyukakban azonos sűrűségben növesztettük (endothel: 6000 sejt/well, astrocyta: 8-10000 sejt/well, pericyta: 5000 sejt/well), majd stationer fázisban (fenolvörösmentes, alacsony glükóz tartalmú DMEM-ben) 6-8 párhuzamost alkalmazva 24, illetve 48 óráig kezeltük (natív LDL [Biomedical Technologies Inc.]: 200ug/ml, oxLDL [Biomedical Technologies Inc.]: 50, 100, 150, 200ug/ml, 1% TritonX-100).

### 3.25. *In vitro* toxicitás vizsgálat/LDH teszt

Dr. Deli Mária és munkatársai segítségével, a primer sejtek oxLDL kezelés hatására bekövetkező membránkárosodását vizsgáltuk LDH teszt segítségével. A mérés alapját a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim mennyiségének mérése képezi. Ez az enzim kizárólag sejten belül található, azonban bizonyos ágensek okozta citotoxicitás esetén a pusztuló sejtekből kiszabadul, és a médiumba kerül, amiből mennyisége spektrofotometriásan (492 nm) meghatározható. A sejtekből felszabaduló citoplazmatikus LDH enzim membránkárosodást jelez, ezért a nekrotikus sejtpusztulás indikátoraként is használható. A membránkárosító, nekrozist okozó hatás mértékével arányosan nő a felülúszóból mérhető LDH mennyisége.

A méréshez a sejtekről 40 ul kezelő médiumot (fenolvörösmentes, alacsony glükóz tartalmú DMEM, Hyclone) szívunk le, amelyhez 40 ul LDH reagenst (Cytotoxicity Detection kit [LDH], Roche) adtunk. A reagens kétkomponensű, 1 rész Catalyst oldatot és 45 rész festéket tartalmazott. A sejteket ezután 20-30 percig enyhe rázatás mellett, sötétben inkubáltuk. A reakciót végül 8 ul 1M HCl-al állítottuk le, majd plate readerrel (FLUOStar Optima, BMG Labtech) 492 nm-en abszorbanciát mértünk. Pozitív kontrollként 1% Triton X-100-at használtunk, majd a citotoxicitás mértékét ennek százalékában fejeztük ki. (Az 1% Triton X-100-zal kezelt sejtekből felszabaduló LDH mennyiségét 100%-nak véve.) Az adatok

statisztikai elemzéséhez kétszemponos ANOVA-t használtunk, amit Bonferroni poszt-hoc teszttel egészítettünk ki. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### 3.26. *In vitro* ROS mérés primer sejteken

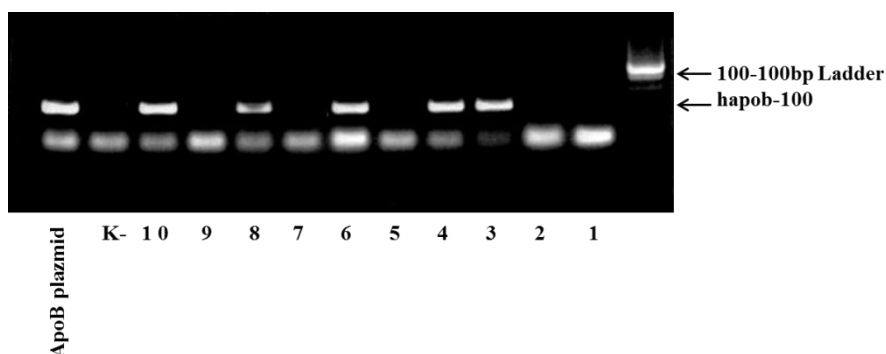
Dr. Deli Máriával és munkatársaival együttműködésben a primer sejtekben oxLDL kezelés hatására termelődő ROS mennyiségét vizsgáltuk fluoreszcens indikátor segítségével. Primer astrocytákat, pericytákat és endothelsejteket (5-6000 sejt/well sűrűségben) 96-os plate-ben 1 óráig 50, 100, 150, 200 ug/ml oxLDL-lel (Biomedical Technologies Inc.) és 200 ug/ml natív LDL-el (Biomedical Technologies Inc.) kezeltünk (7. függelék). (A kezelés fenolvörösmentes, szérumentes, alacsony glükóz tartalmú, 0,1% BSA- DMEM-ben történt.) A kezelést követően a sejtekben termelődő ROS mennyiségét követtük nyomon 1 órán keresztül plate readerrel (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) 3-5 percenként fluoreszcencia intenzitást mérve. A mérésekhez a következő fluoreszcens indikátort használtuk: CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes). Az indikátort 1 uM végkoncentrációban alkalmaztuk Ringer-Hepesben 1 óráig 37 C°-on inkubálva a sejtekkel. Az indikátor penetrációjának elősegítésére pluronsavat adtunk a rendszerhez. A méréshez 100 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot alkalmaztunk pozitív kontrollként. Az adatok statisztikai elemzéséhez kétszemponos ANOVA-t használtunk, amit Bonferroni poszt-hoc teszttel egészítettünk ki. Az értékeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 1. Milyen hatással van a krónikus hipertrigliceridémia az agyi lipidmetabolizmusra?

#### 4.1. A humán *APOB* transzgenikus egerek genotipizálása

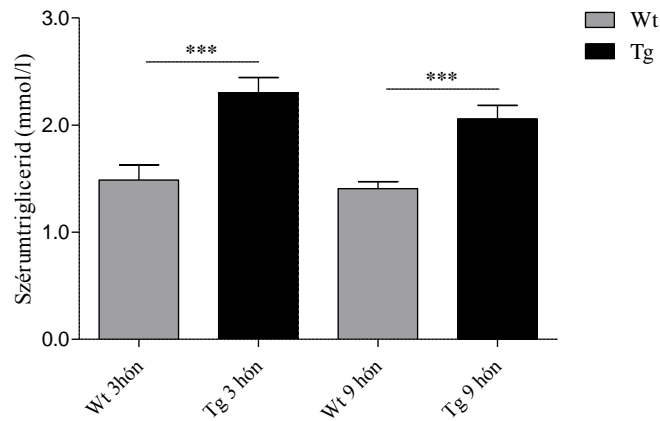
A kísérleti csoportok kijelölése során gondosan ügyeltünk az egerek pontos és precíz genotipizálására. Indokolt esetben a PCR-kat többször megismételtük, szükség esetén a reakciókörülményeket újfent optimalizáltuk. Következésképpen csak az egyértelmű eredményeket fogadtuk el, ennek érdekében megfelelő pozitív és negatív kontroll DNS mintákat alkalmaztunk.



1. ábra: Egy reprezentatív gélfotó (1,5% AGE) az *APOB* egerek genotipizálásáról (485B1A551A3A9A5A2/1-10 család esetén).

#### 4.2. Szérumtriglicerid-mérés

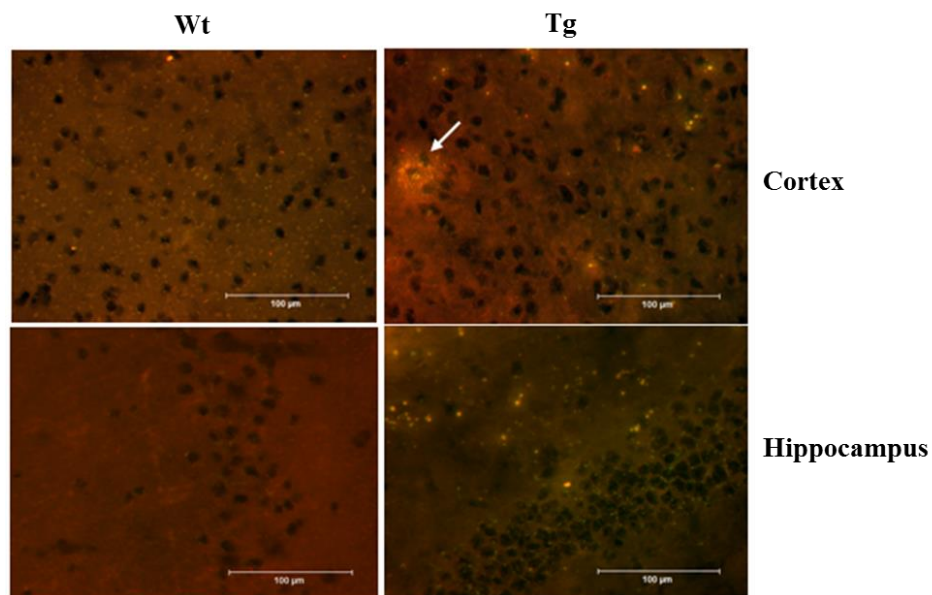
Az ApoB májban, aortában és szívben való túltermelődése magas szérumtriglicerid-szint kialakulásához vezet. A transzgén hatása már fiatal (3 hónapos) korban megnyilvánul (2. ábra). 3 hónapos Tg egerek szérumtriglicerid-szintje ( $2,4 \pm 0,25$  mmol/l) szignifikánsan magasabb ( $p < 0,001$ ), mint Wt-ú alomtársaiké ( $1,42 \pm 0,27$  mmol/l). Ez a különbség későbbi életkort (9 hónapos) tekintve is fennáll (2. ábra): 9 hónapos Tg egerek szérumtriglicerid-mennyisége ( $2,058 \pm 0,26$  mmol/l) szintén szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) a Wt értéke ( $1,408 \pm 0,14$  mmol/l) fölé magasodik. Az ApoB-100 túltermelődése tehát igazoltan hipertrigliceridémiához vezet.



2. ábra: Fiatal (3 hónapos) és felnőtt (9 hónapos) Tg (fekete oszlop) és Wt egerek (szürke oszlop) szérumtriglicerid-értékei mmol/l egységben (átlag $\pm$ SEM, N=6 (3 hónapos), N=7 (9 hónapos)). \* Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,001$ , statisztikai próba: kétszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt).

#### 4.3. Agyi lipidmetabolizmus

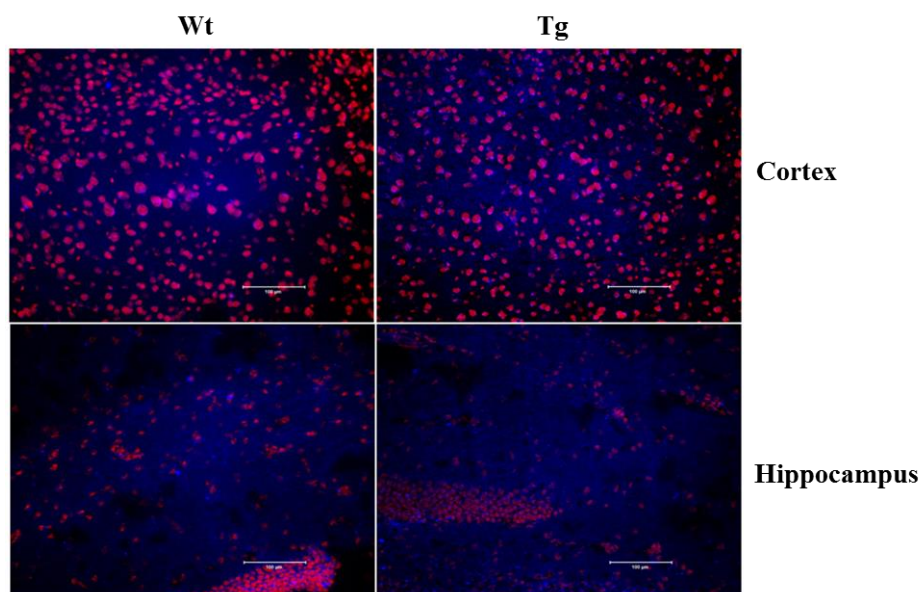
Az agyszövetben felhalmozódó triglicerideket Nílus vörös festéssel mutattuk ki. A magas szérumtriglicerid-értékeknek megfelelően korosodó (10 hónapos) Tg egerekben a trigliceridszint az agyban is emelkedést mutat. A Tg állatok kortikális és hippokampális agyrégiójában lipidcseppek megjelenését tapasztaltuk, míg a Wt-ú állatokban ez nem volt kimutatható (3. ábra).



3. ábra: Triglicerid és foszfolipid tartalmú lipidcseppek (fehér nyíl) Wt és Tg egerek agyszövetében (N=3-3). Nílus vörös festés (400x nagyítás, mérce: 100 $\mu$ m).



Az agyi trigliceridmennyiségről gyűjtött információ túl, arra is kíváncsiak voltunk, hogy van-e fokozott koleszterin-metabolizmus a Tg egerek agyszövetében? Kérdésünkre az agyszövetből készült metszetek Filipin festésével kerestük a választ. A koleszterin mennyiségének tekintetében nem találtunk különbséget az egyes genotípusok között sem fiatal, sem pedig idősebb korban. Koleszterin akkumuláció nem tapasztalható egyik vizsgált csoportban sem (4. ábra).

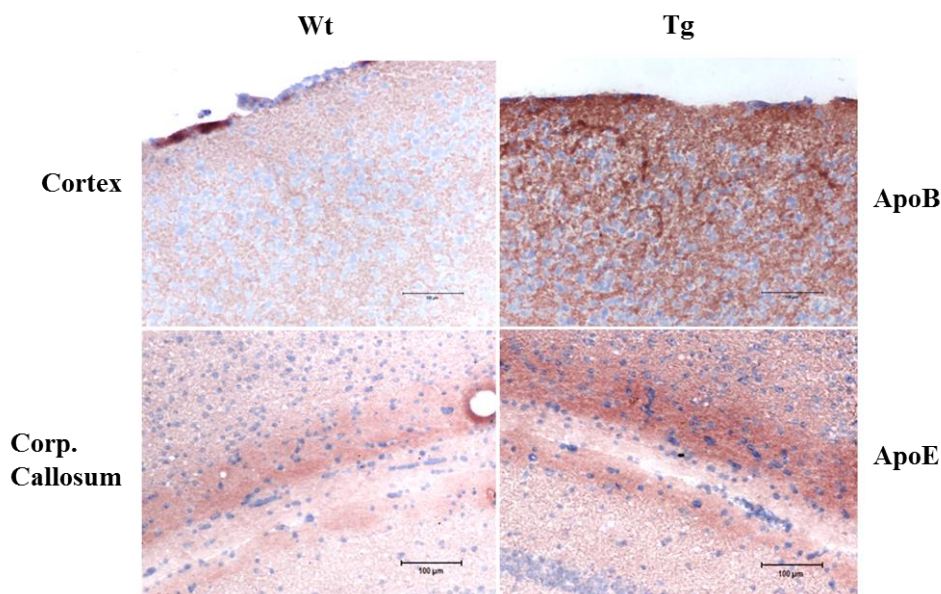


4. ábra: Nem észterezett (szabad) koleszterin Tg és Wt egerek agyszövetében (N=3-3). Filipin festés (200x nagyítás, mérce: 100um).

#### 4.4. Lipoprotein-, és amiloidmetabolizmus

Az ApoE az egyik legnagyobb mennyiségben termelődő lipoprotein az agyban, elsősorban astrocyták szintetizálják. Számtalan funkciója közül a celluláris koleszterinszintézis-, és transzport emelendő ki, azonban mennyisége idegi sérülés során is megemelkedik. Tg egerek középagyi területein (pl. substantia nigra) és corpus callosumában fokozott ApoE immunreaktivitás figyeltünk meg, ami intenzívebb lokális koleszterin-, és foszfolipid-metabolizmusra, vagy regenerációs folyamatra utalhat (5. ábra).

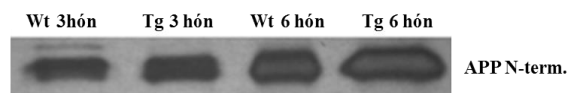
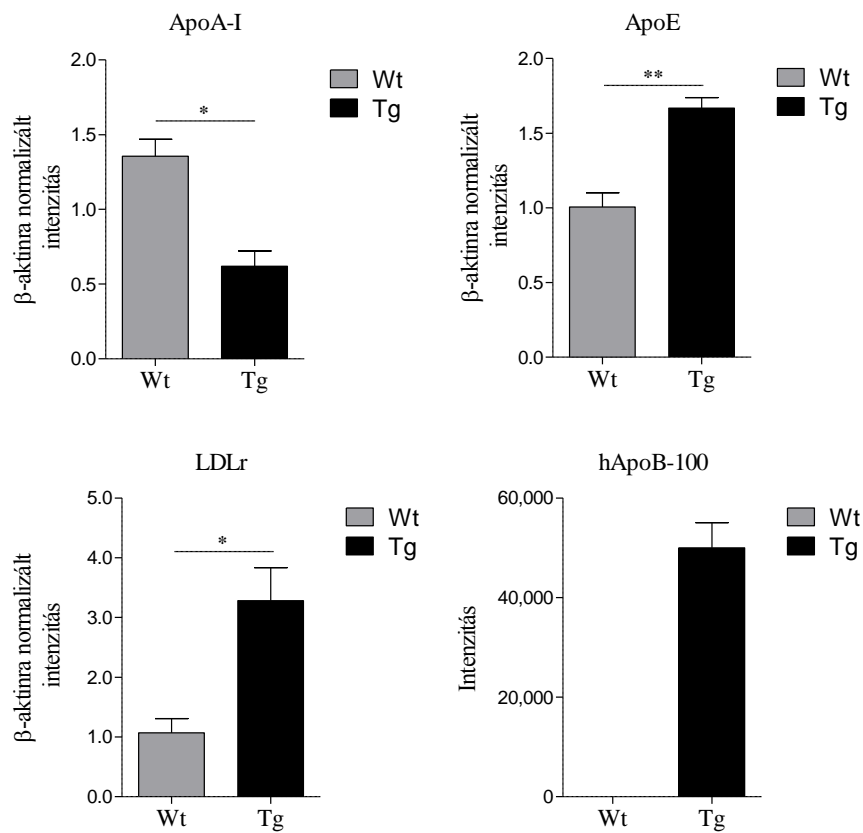
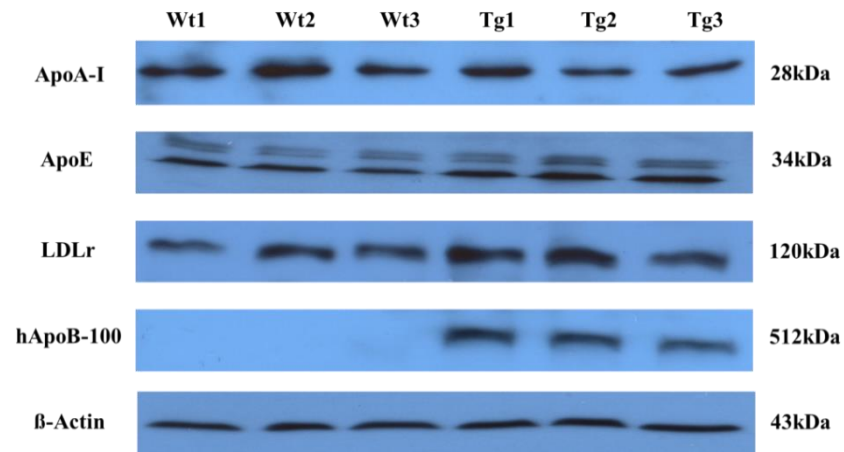
A magas szérumtriglicerid-szinttel és az intracelluláris lipidcseppek megjelenésével párhuzamosan, intenzív ApoB-100 festődést mutattunk ki Tg egerek striátumában, corpus callosumában és asszociációs kérgi sejtjeiben (5. ábra). Hisztológiai megfigyeléseinket western blot elvégzésével egészítettük ki, illetve erősítettük meg (lásd: 6. ábra).



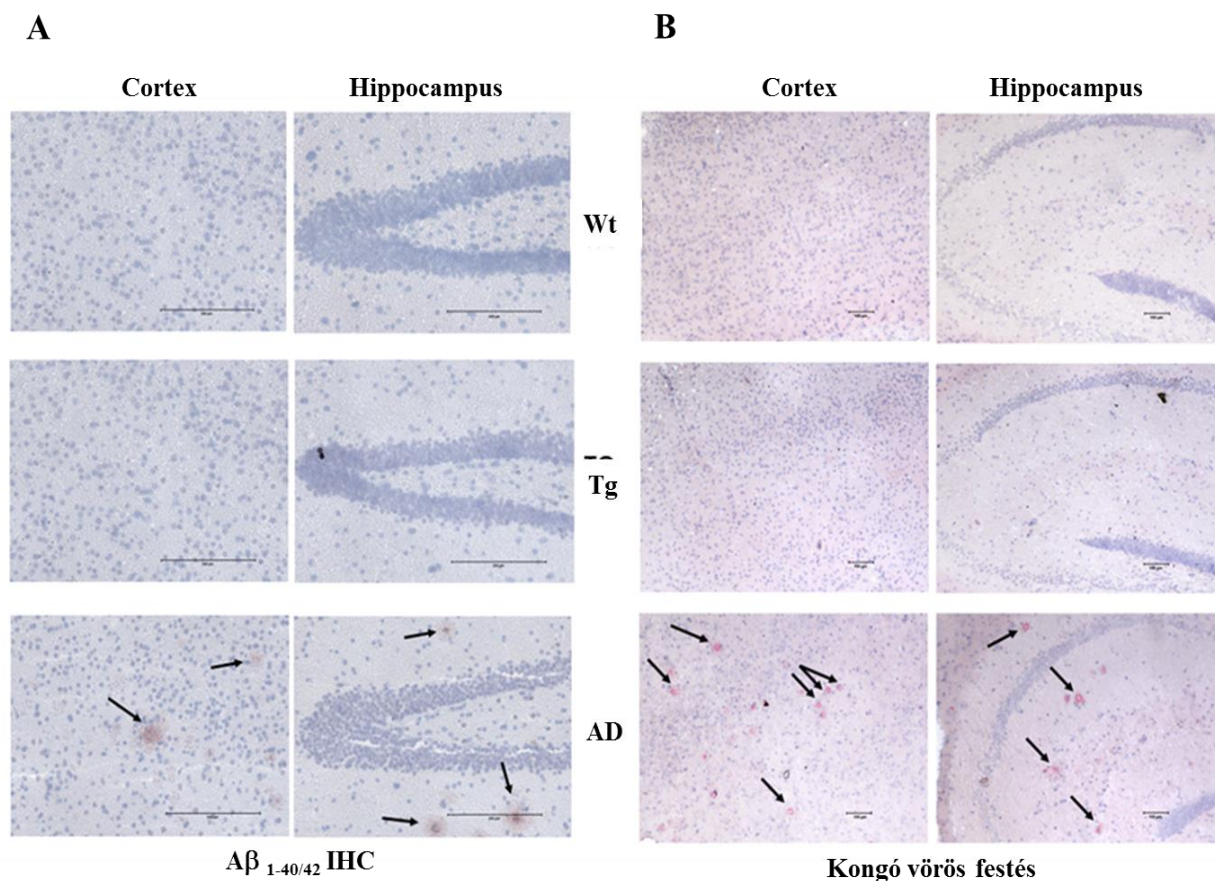
5. ábra: Peroxidázos IHC: anti-ApoE és anti-hApoB-100 (100x nagyítás, mérce: 100um) ellenanyagokkal az asszociációs kéreg és a corpus callosum területén (Wt és Tg egereken, N=3-3).

Az immunhisztokémiával detektált lipoproteinek relatív mennyiségét 6 hónapos egerek agykérgi mintáiban western blottal vizsgálva (6. ábra) azt tapasztaltuk, hogy míg az ApoA-I mennyisége szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,05$ ), addig az ApoE, az LDLr, valamint az ApoB-100 mennyisége Tg egerekben szignifikánsan nagyobb ( $p_{\text{ApoE}} < 0,01$ ,  $p_{\text{LDLr}} < 0,05$ ,  $p_{\text{ApoB}} < 0,001$ ) a Wt-hoz képest. A vizsgált fehérjék mennyiségét az egyes mintákban  $\beta$ -aktinra normalizáltuk, majd a csoportok összehasonlítása során ezeket az értékeket használtuk fel.

Neurodegeneratív betegségekre (különösen az Alzheimer-kórra) jellemző az APP hibás hasítása, és ennek következtében az  $A\beta_{1-40/1-42}$  peptid felhalmozódása, valamint extracelluláris amiloid plakkok kialakulása a hippocampusban és az agykéregben. Az amiloid plakkok jelenlétét egy kevésbé specifikus, alkalikus Kongó vörös festést (7. B ábra), illetve specifikus,  $A\beta_{1-40/42}$  immunhisztokémiát (7. A ábra) alkalmazva kíséreltük meg kimutatni. Jóllehet az APP N-terminális részére specifikus ellenanyaggal a fehérje mennyiségének növekedését tapasztaltuk Tg egerekben a Wt-hoz viszonyítva (lásd: 6. ábra), amiloid plakkokat nem tudtunk kimutatni sem a hippocampusban, sem pedig az agykéregben még specifikus ellenanyagok ( $A\beta_{1-40/42}$ ,  $A\beta_{1-42}$ ) használatával sem (7. A ábra). Pozitív kontrollként APP<sup>swe</sup> x PSEN1<sup>dE9</sup> kettős transzgenikus AD modell egerek agyszövet mintáit használtuk, amelyekben mindkét festéssel nagyszámú amiloid plakkot sikerült detektálni (7. A és B ábra).



6. ábra: Lipoproteinek és az APP relatív agykérgi expressziója (átlag $\pm$ SEM) Wt (szürke oszlop) és Tg (fekete oszlop) egerekben (N=3-3)  $\beta$ -aktinra normalizálva, \* Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva (p<0,05, ill. p<0,01, statisztikai próba: egymintás T-próba).



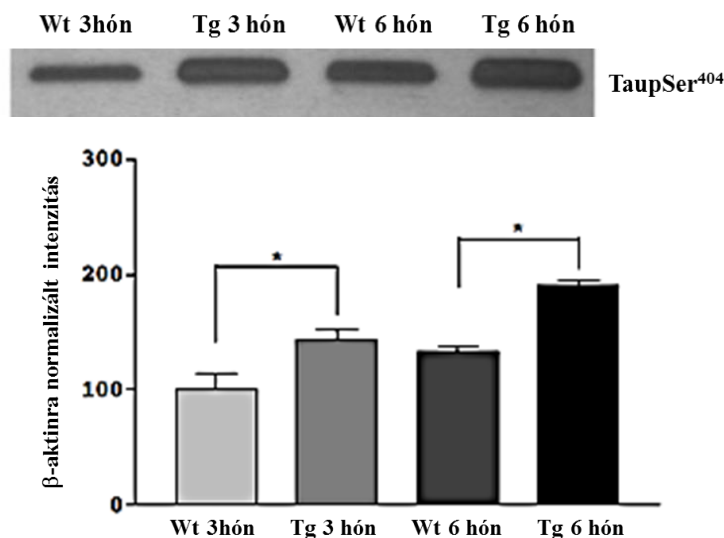
7. ábra: A: Aβ<sub>1-40/42</sub> IHC (Nagyítás: 200x, Mércse: 200um) és B: Kongó vörös festés (Nagyítás: 100x, Mércse: 100um) asszociációs kéreg, hippocampus és gyrus dentatus területén. AD (APPswe x PSEN1dE9 kettős) transzgenikus egérből származó agyszövet mintát használtunk pozitív kontrollként.

## 2. Mik a hiperlipidémia következtében kialakuló neurodegeneratív elváltozások főbb jellemzői?

### 4.5. A Tau-fehérje hiperfoszforilációja

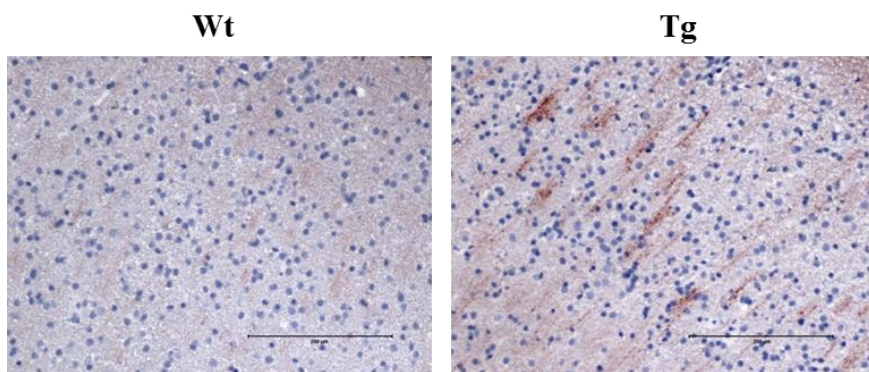
A neurodegeneratív elváltozások másik fő hisztopatológiai megnyilvánulása a fehérje aggregátumok mellett, a hiperfoszforilált Tau-fehérjék megjelenése. A Tau-fehérje foszforiláltságát szemikvantitatív és kvantitatív western blottal, valamint immunhisztokémiával vizsgáltuk. Első lépésben a TaupSer<sup>404</sup>-fehérje mennyiségét vizsgáltuk 3 és 6 hónapos Tg, illetve Wt-ú egerekben. Kimutattuk, hogy mind 3, mind pedig 6 hónapos korban a Tg egerek agykérgében szignifikánsan nagyobb a TaupSer<sup>404</sup>-fehérje mennyisége a Wt-hoz képest ( $p_{3\text{hón}} < 0,05$ ,  $p_{6\text{hón}} < 0,05$ ) (8. ábra). Belső kontrollként β-aktint használtunk és az egyes mintákat erre normalizáltuk.





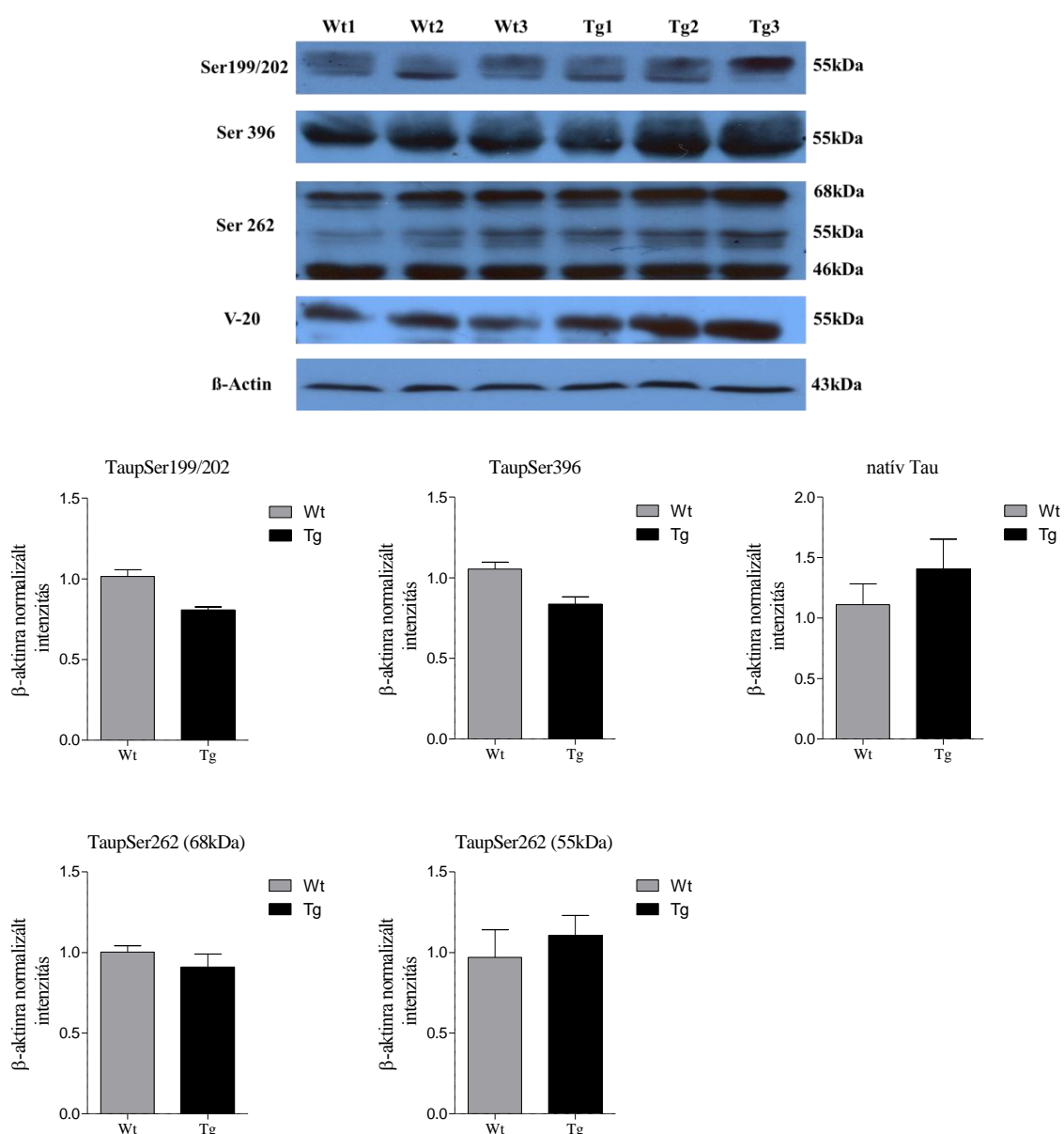
8. ábra: A TaupSer<sup>404</sup>-fehérje β-aktinra normalizált kérgi expressziója (átlag ± SEM) 3, illetve 6 hónapos Wt (szürke oszlopok) és Tg (fekete oszlopok) egerekben (N=3-3). \* Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,05$ , statisztikai próba: egymintás T-próba).

A foszforilált Tau-fehérje szöveti kifejeződésének mintázatát vizsgálva azt találtuk, hogy a TaupSer<sup>404</sup> ellenanyaggal jelölt metszeteken Tg egerek agykérgében axo-szomatikus lefutású, az intracelluláris neurofibrilláris kötegekre emlékeztető szövettani struktúrák jelennek meg, míg ezek a Wt-ú metszeteken nem mutathatóak ki (9. ábra). Mivel az általunk használt ellenanyag a Tau-fehérje egy hiperfoszforilált formájára specifikus, elmondhatjuk, hogy a Tau-fehérje a Ser<sup>404</sup> foszforilációs helyen Tg egerek agykérgében hiperfoszforilálttá válik és neurofibrilláris kötegek formájában az agyszövetben felhalmozódik. Ismert, hogy a Ser<sup>404</sup>-es helyen foszforilált Tau az Alzheimer-kór során is nagy mennyiségben van jelen, jellemzően az extra-neuronális neurofibrilláris kötegekben.



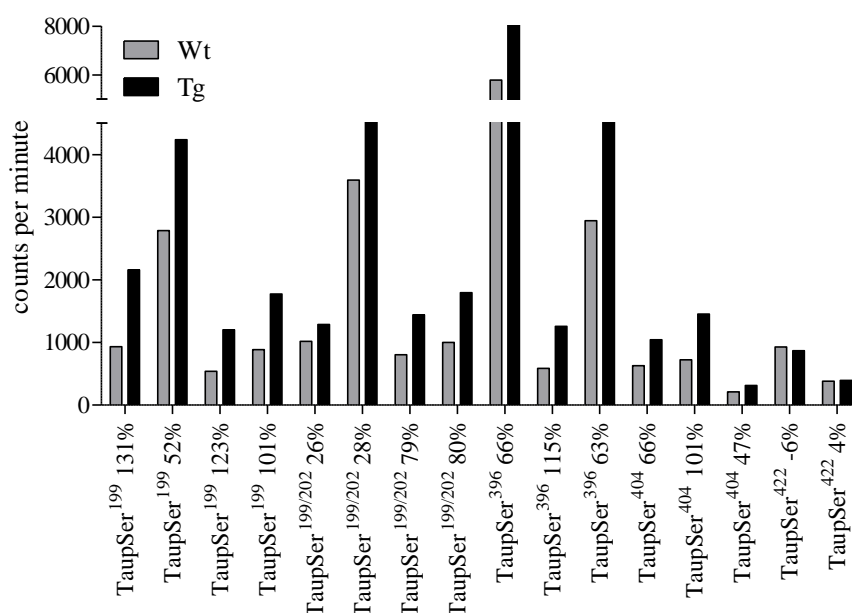
9. ábra: TaupSer<sup>404</sup> IHC Wt és Tg egerek (N=3-3) asszociációs kérgének területén (Nagyítás: 200x, Mérce: 200um).

A továbbiakban megvizsgáltuk a Tau-fehérjék foszforiláltságát 3 és 6 hónapos Tg egerek agykérgében, különös tekintettel azokra a foszforilációs helyekre, amelyeken Alzheimer-kór és cerebrovaszkuláris-eredetű neurodegeneratív kórképek során a leggyakrabban hiperfoszforilálttá válnak. Az általunk vizsgált foszforilált formák a neurofibrilláris degeneráció valamennyi NFT fázisát reprezentálják, esetünkben azonban a hisztológiai eredmények szerint főként az extra-neuronális neurofibrilláris kötegek jellemző komponensei.



10. ábra: 3 hónapos állatok (Wt és Tg, N=3-3) agykérgi mintáinak  $\beta$ -aktinra normalizált relatív foszforilált-Tau expressziója (átlag $\pm$ SEM, statisztikai próba: egymintás T-próba).

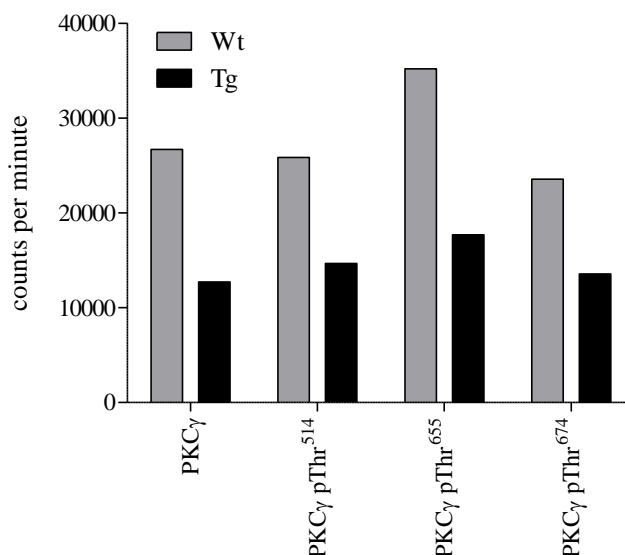
Három hónapos egerek agykérgében azt találtuk, hogy a TaupSer<sup>199/202</sup>, a TaupSer<sup>396</sup>, a TaupSer<sup>262(68kDa)</sup> és a TaupSer<sup>262(55kDa)</sup> mennyiségében nincs szignifikáns különbség a Tg és a Wt-ú állatok között. Bár a foszforilálatlan (natív) Tau (Tau V-20) mennyisége Tg állatokban kis mértékben megnövekedett, de ez a különbség nem volt szignifikáns (10. ábra). A legfontosabb eredmény számunkra az volt, hogy a foszforilálatlan Tau (Tau V-20) mennyisége a két csoportban nem tér el szignifikánsan egymástól. Tehát az általunk különböző foszforilációs helyekre specifikus ellenanyagokkal kapott eredmények nem a foszforilálatlan forma különböző mennyiségéből adódnak. (Belső kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk, az egyes mintákat erre normalizáltuk.)



11. ábra: 6 hónapos állatok (Wt és Tg, N=3-3) kérgi mintáinak kvantitatív Tau-foszforilációs profil vizsgálata.

A 6 hónapos állatok (Wt és Tg) agykérgi mintáinak Tau-foszforilációs profil (Immunoblotting Phosphosite Profiling) analízisét a kanadai Kinexus cég végezte el számunkra. A vizsgálatokhoz 14 különböző gyártótól származó foszfospecifikus ellenanyagot használtak fel, és az eredményeket a chemilumineszcens jelek kvantitatív mérése alapján határozták meg (lásd: Anyagok és Módszerek). Az alábbiakban a relatív mennyiségi változásokat a Wt értékeit 100%-nak véve adtuk meg. Az eredmények szerint Tg egerekben a Tau-fehérje több oldalláncon is hiperfoszforilálódik a Wt-hoz képest: a Ser<sup>199</sup>-en (átlagosan további 101,75%-kal), a Ser<sup>199/202</sup>-n, (átlagosan további 53,25%-kal), a Ser<sup>396</sup>-on (átlagosan további 81,33%-kal) és a Ser<sup>404</sup>-en (átlagosan további 71,33%-kal) (11. ábra). A PKC- $\gamma$

menyisége (12. ábra) különbözik a két genotípus között a Wt javára (52%-kal nagyobb, mint a Tg-ban), ami a foszforilált formák esetében ugyanígy igaz (Thr<sup>514</sup>: átlagosan 43%-kal, Thr<sup>655</sup>: átlagosan 50%-kal, Thr<sup>674</sup>: átlagosan 42%-kal nagyobb a Tg-hoz képest).

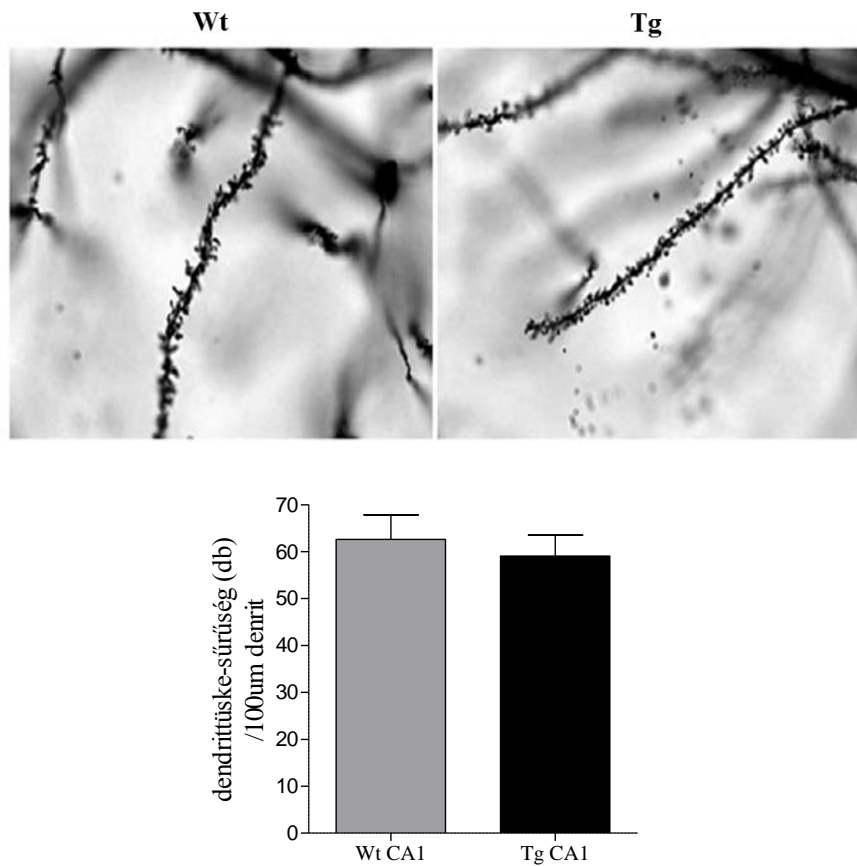


12. ábra: 6 hónapos állatok (Wt és Tg, N=3-3) kérgi mintáinak kvantitatív PKC- $\gamma$  foszforilációs vizsgálata.

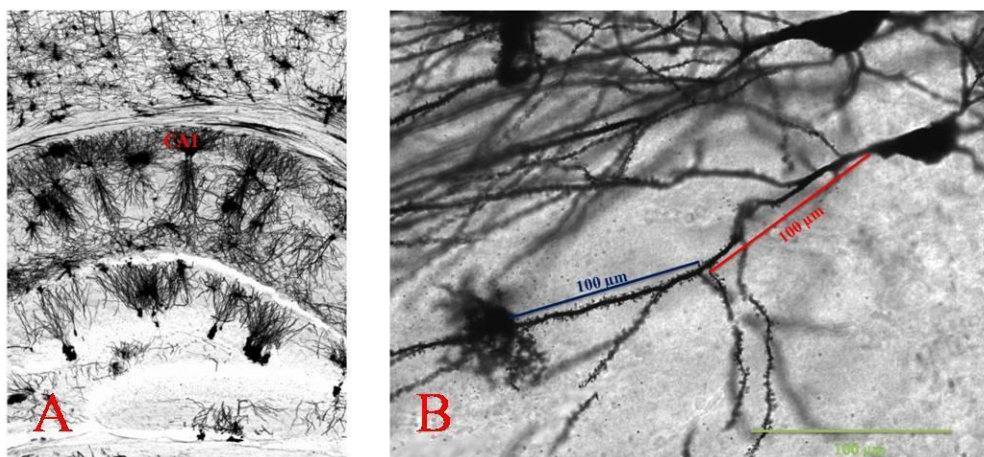
#### 4.6. Neuronális apoptózis, neurodegeneráció

A molekulárisan és hisztológiailag igazolt Tau hiperfoszforiláció ismerten a mikrotubulus hálózat széteséséhez, axonális degenerációhoz, végül neuronális apoptózishoz vezet. Mindezek a neurodegeneráció klasszikus hisztopatológiai megnyilvánulásai. Szerettük volna funkcionális és morfológiai szempontból is igazolni a neurodegeneratív elváltozások jelenlétét. Ennek alátámasztására a hippocampusz CA1 régiójában található neuronok apikális dendrittüskéinek kvalitatív és kvantitatív összehasonlítását végeztünk el transzgenikus és vad típusú egerekben (13 és 14. ábra). A vizsgálatokat prof. Penke Botond csoportjával együttműködésben végeztük. Azt találtuk, hogy Tg állatokban a dendrittüskék következetesen rövidebbek, mint a Wt egerekben. Kvantitatív összehasonlítás során azt tapasztaltuk, hogy a Tg állatokban átlagosan kevesebb dendrittüske ( $47,78 \pm 3,79$ ) számolható meg, mint a Wt állatokban ( $63,68 \pm 10,7$ ). Bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns ( $p=0,053$ ), de erős, határozott trendet mutat (13. ábra).





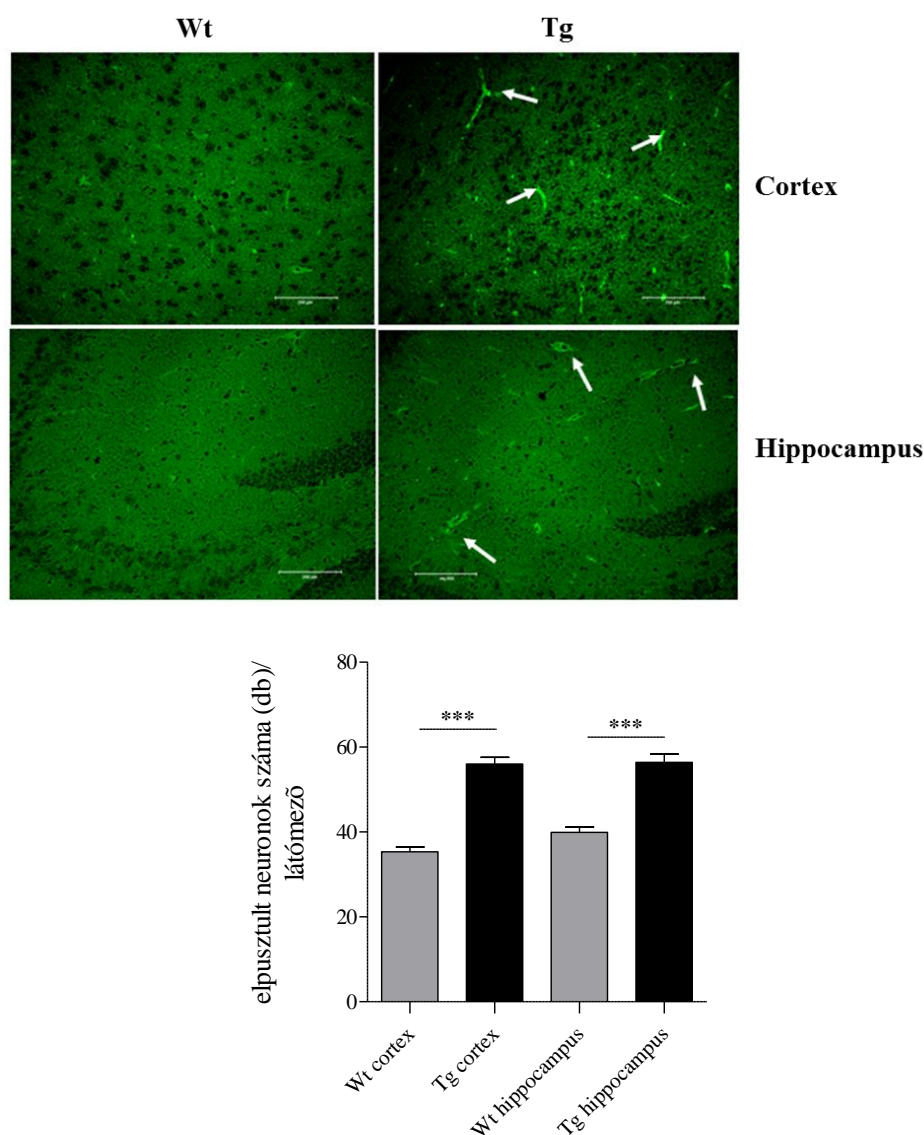
13. ábra: A stratum radiatum neuronjainak (hippocampus CA1 régió) dendrittüske morfológiája, mintázata (Nagyítás: 1000x), illetve denzitása (átlag±SEM, statisztikai próba: egymintás T-próba) Wt és Tg egerekben (N=5-5).



14. ábra: A: Hippocampus CA1 régiójának (50x nagyítás) és B: a stratum radiatum neuronjainak (Nagyítás: 400x, Mércse: 100μm) ezüst impregnációs morfológiája. A szómától 100μm távolságra lévő (piros vonal), 100μm hosszúságú szakaszon (kék vonal) vizsgáltuk a dendrittűskék eloszlását.

A következőkben a neuronális sejtpusztulás mértékét Fluoro-Jade C festéssel vizsgáltuk. A Fluoro-Jade C festék a neurodegeneráció mechanizmusától függetlenül, minden

degenerálódott idegsejtet (szómát, axont és akár távoli dendriteket is) megfest (Schmued és mtsai. 2005). Az agyterületek mikroszkópos vizsgálata során azt találtuk, hogy a Tg állatok agykérgében ( $59 \pm 5,57$ ), illetve hippocampusában ( $50 \pm 9,5$ ) szignifikánsan több ( $p < 0,001$ ) elpusztult idegsejt látható, mint a Wt-ban (agykéreg:  $37,97 \pm 4,42$ ; hippocampus:  $35,42 \pm 5,85$ ) (15. ábra).



15. ábra: Elpusztult idegsejtek (fehér nyilak) száma (átlag $\pm$ SEM) Fluoro-Jade C festéssel egerek (Wt és Tg, N=6-6) agyszövetében (Nagyítás: 200x, Mércse: 200um, látómező mérete: 1150umx850um). \*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,001$ , statisztikai próba: egymintás T-próba).

A neuron elhalás módját, miszerint jelen esetben apoptózisról és nem nekrozisról van szó, az apoptózis késői fázisában megjelenő DNS fragmentáció detektálásával mutattuk ki

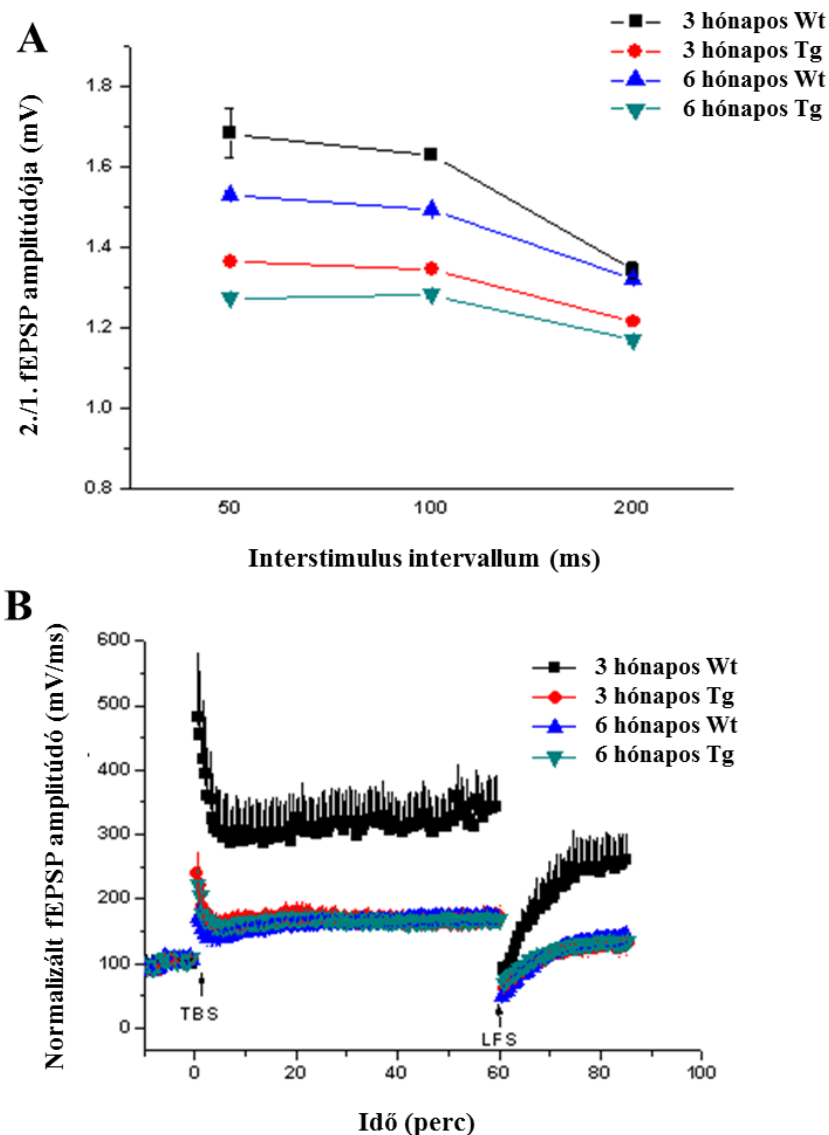
egy korábbi projekt keretében Tunel Assay (ApopTag Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) segítségével (Bereczki és mtsai. 2008., 5. függelék).

#### 4.7. Elektrofiziológia

Azért, hogy az előzőekben bemutatott biokémiai és molekuláris biológiai változások preszinaptikus funkcióra gyakorolt hatását is megvizsgáljuk, hippocampus szeleteken elektrofiziológiai méréseket végeztünk. A méréseket dr. Szegedi Viktor és munkatársai végezték el számunkra.

A sejtek általános serkenthetőségét (excitabilitását) tekintve nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes genotípusok között. Következő lépésben PPF-s protokollt alkalmaztunk (16. A ábra) különböző interstimulus intervallumokkal (50, 100, 200 ms). Normál esetben egy preszinaptikus neuront két egymást követő stimulussal ingerelve az ingerre adott válaszok amplitúdója egymástól eltér, a második mezőpotenciál nagyobb lesz, mint az első. A PPF protokoll tehát az ingerlésre adott válaszok (akciós potenciál) amplitúdóinak arányát vizsgálja. A PPF (neuronális facilitáció) rövidtávú szinaptikus plaszticitás egy formája. A neuronális facilitáció mechanizmusa kizárólag preszinaptikus, a megnövekedett  $Ca^{2+}$  koncentráció és neurotranszmitter felszabadulás eredménye.

Ezen funkcióban (16. A ábra) már szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség mutatkozott a két genotípus között. A Tg állatokban alacsonyabb PPF arányokat (2. fEPSP/1. fEPSP) kaptunk minden interstimulus intervallumban (1,35 $\pm$ 0,01 50 ms-nál; 1,34 $\pm$ 0,01 100 ms-nál; 1,21 $\pm$ 0,01 200 ms-nál 3 hónapos korban, és 1,27 $\pm$ 0,01 50 ms-nál; 1,29 $\pm$ 0,01 100 ms-nál; 1,17 $\pm$ 0,01 200 ms-nál 6 hónapos korban) a Wt-hoz viszonyítva (1,68 $\pm$ 0,062 50 ms-nál; 1,63 $\pm$ 0,01 100 ms-nál; and 1,35 $\pm$ 0,02 200 ms-nál 3 hónapos korban és 1,53 $\pm$ 0,01 50 ms-nál; 1,49 $\pm$ 0,01 100 ms-nál; 1,32 $\pm$ 0,01 200 ms-nál 6 hónapos korban). Érdekes módon az öregedés önmagában is befolyásolta a preszinaptikus funkciót: az idősebb (6 hónapos) egerek csökkent PPF aránnyal rendelkeztek a fiatalokhoz (3 hónapos) képest, tekintet nélkül a genotípusra.



16. ábra: A: PPF és B: LTP (átlag $\pm$ SEM) 3 és 6 hónapos (Wt és Tg, N=6-6) egerek hippocampus szeletein. 3 és 6 hónapos Tg egerek szignifikánsan ( $p < 0,05$ , statisztikai próba: egymintás T-próba) kisebb PPF értékkel rendelkeznek a Wt-hoz képest.

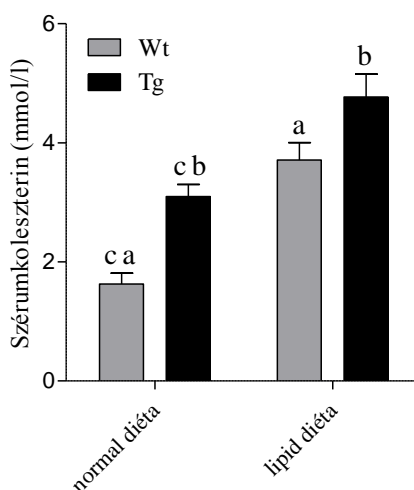
A szinaptikus plaszticitás vizsgálatára (16. B ábra) theta-burst stimulációval hosszú távú szinaptikus hatékonyságfokozódást (LTP) váltottunk ki. 60 perc után a kiváltott válaszokat alacsony frekvenciás ingerléssel (LFS) depotencióztuk. A fiatal (3 hónapos) Tg állatokból származó szeletek csökkent LTP-t mutattak a Wt-hoz képest ( $176 \pm 13\%$  a Tg, míg  $343 \pm 46\%$  a Wt egerekben 60 perccel a TBS után). Érdekes módon az idősebb (6 hónapos) állatok azonos mértékű LTP-t mutatnak, tekintet nélkül a genotípusra ( $168 \pm 10\%$  Tg egerekben, míg  $173 \pm 11\%$  a Wt egerekben 60 perccel a TBS után). Az LFS által kiváltott depotenciózódás mértéke nem különbözött a genotípusok között. Abban az esetben, ha az

LFS előtti 15 perces szakaszt 100%-nak tekintjük, az fEPSP-k amplitúdója fiatal Wt állatokban  $79 \pm 10\%$ , míg Tg-ban  $75 \pm 12\%$ . 30 perccel az LFS után az fEPSP-k amplitúdója idősebb Wt állatokban  $83 \pm 12\%$ , míg  $80 \pm 8\%$  a Tg egerekben.

### 3. Milyen hatása van a hiperlipidémiának a vér-agy gát funkcióra?

#### 4.8. In vivo vér-agy gát funkció vizsgálat

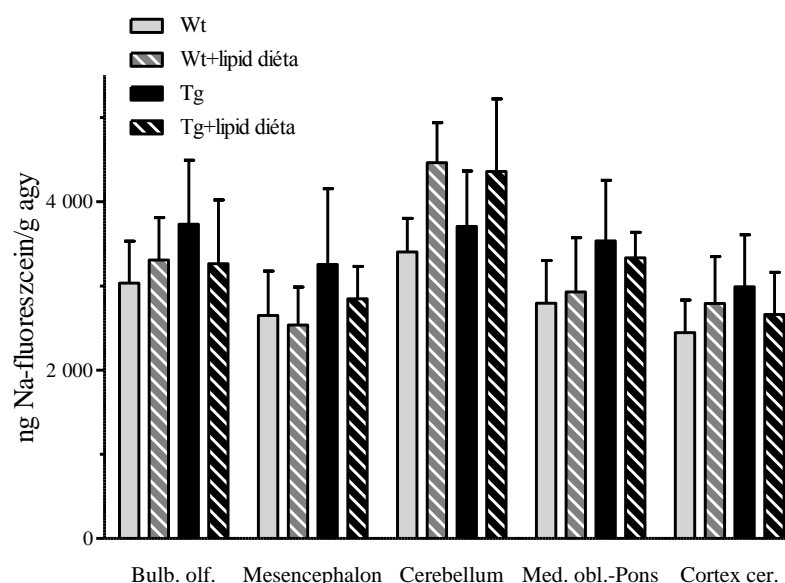
Feltételezésünk szerint Tg egerekben a tartós hiperlipidémia a vér-agy gát működésének zavarát idézi elő. Ezért 4 hetes lipidgazdag diétával Tg és Wt egereinkben hiperkoleszterinémiát idéztünk elő. Jóllehet, normál tápon tartva a Tg egerek átlagos szérumkoleszterin-értékei (összkoleszterin) szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) magasabbak, mint Wt alomtársaiké, a lipidgazdag diéta mindkét csoportban jelentősen megemelte a szérumkoleszterin értékeket (17. ábra). Mivel a lipidgazdag diéta a Wt állatokban nagyobb mértékben emelte meg a szérumkoleszterin szintet, mint a Tg állatokban, a két diétán tartott csoport (Tg etetett kontra Wt etetett) közötti különbség csökkent, de továbbra is erős trend volt megfigyelhető ( $p = 0,063$ ) (17. ábra).



17. ábra: 4 hétig lipidgazdag táppal etetett egerek (Wt és Tg, N=6 csoportonként) szérumkoleszterin-értékei (átlag $\pm$ SEM, statisztikai próba: kétszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt, ill. egymintás T-próba). Az ábrán látható jelölések magyarázata: a, Wt lipid diéta szignifikáns a Wt normál diétához viszonyítva ( $p < 0,001$ ), b, Tg lipid diéta szignifikáns a Wt lipid diétához viszonyítva ( $p < 0,01$ ), c, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,001$ ).

A 4 hetes lipidgazdag diétát követően fluoreszcens festékekkel (Evans-kék, Na-fluoreszcein) *in vivo* permeabilitás vizsgálatokat végeztünk. A Na-fluoreszcein segítségével a vér-agy gát legfontosabb minőségi paraméteréről, a paracelluláris permeabilitásról (tight junction funkció); az Evans-kék segítségével pedig a transzcelluláris transzport folyamatokról (transzcitózis) kaptunk információt. Összességében elmondható, hogy az egyes agyterületek egymáshoz viszonyítva lényegesen különböző permeabilitás értékekkel rendelkeznek a kis és nagy mólsúlyú anyagokra nézve.

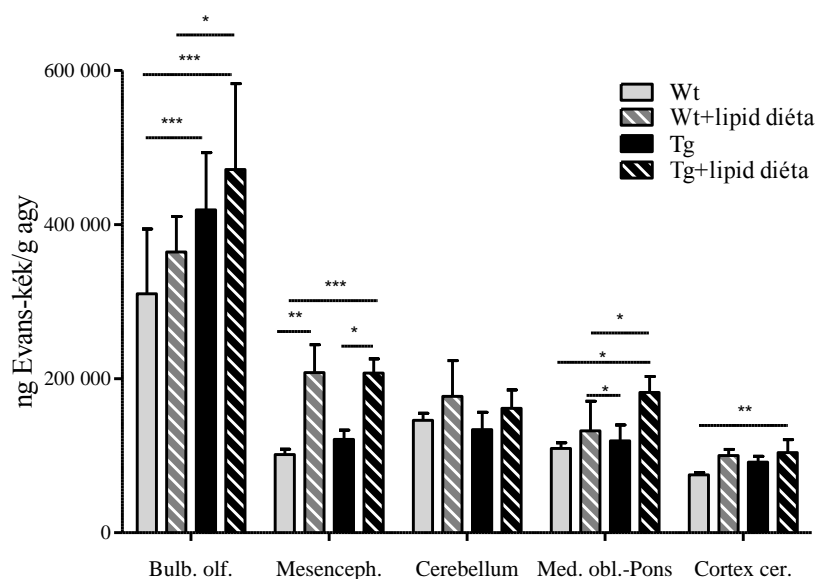
Kis mólsúlyú anyagokra leginkább a szaglógumó, a kisagy, a nyúltvelő és a híd területe átjárható, míg a középagy és a kéreg kevésbé permeábilis (18. ábra). Wt egerekben a lipid diéta hatására majdnem minden vizsgált agyterületen (kivéve: középagy) fokozódik a permeabilitás, míg Tg egerekben szinte mindegyik területen (kivéve: kisagy) csökken. Statisztikai elemzést követően azt kaptuk, hogy Na-fluoreszcein tekintetében nincs szignifikáns különbség az egyes genotípusok között egyik vizsgált agyterület permeabilitásában sem.



18. ábra: Különböző agyterületek paracelluláris (Na-fluoreszcein) permeabilitása (átlag±SEM, N=6 csoportonként, statisztikai próba: kétszemponos, ill. egyszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt) 4 hetes lipidgazdag (61%) diétát követően.

Nagy mólsúlyú (>4-500 Da) anyagok tekintetében leginkább a szaglógumó, a kisagy, a nyúltvelő és a híd átjárható, míg a középagy és a kéreg sokkal kevésbé permeábilis (19. ábra). A lipid diéta hatására minden vizsgált agyterület permeabilitásának jelentős fokozódása figyelhető meg mind a Tg, mind pedig a Wt-ú mintákban (19. ábra). Statisztikailag a normál

és a lipid diétán tartott csoportok között (Wt vs. Wt lipid diéta és Tg vs. Tg lipid diéta) mindegyik agyterületen (a kisagy kivételével) szignifikáns különbséget tapasztaltunk (pCtx<sub>Wt</sub> vs. Tg+lipid<0,001; pMesenc. Wt vs. Tg+lipid<0,001; pMo-Pons<sub>Wt</sub> vs. Tg+lipid<0,05; pBo. Wt vs. Tg+lipid<0,001), jóllehet a vizsgált genotípusok között (Wt vs Tg) nincs szignifikáns különbség az agyterületek többségének permeabilitását illetően (kivéve a szaglógumót, p<0,001) (19.ábra). Mivel a fenti adatok 14-15 hónapos állatok mintáiból származtak, feltétlenül szükségesnek tartjuk a kísérlet elvégzését fiatalabb, 6-7 hónapos állatokon is.



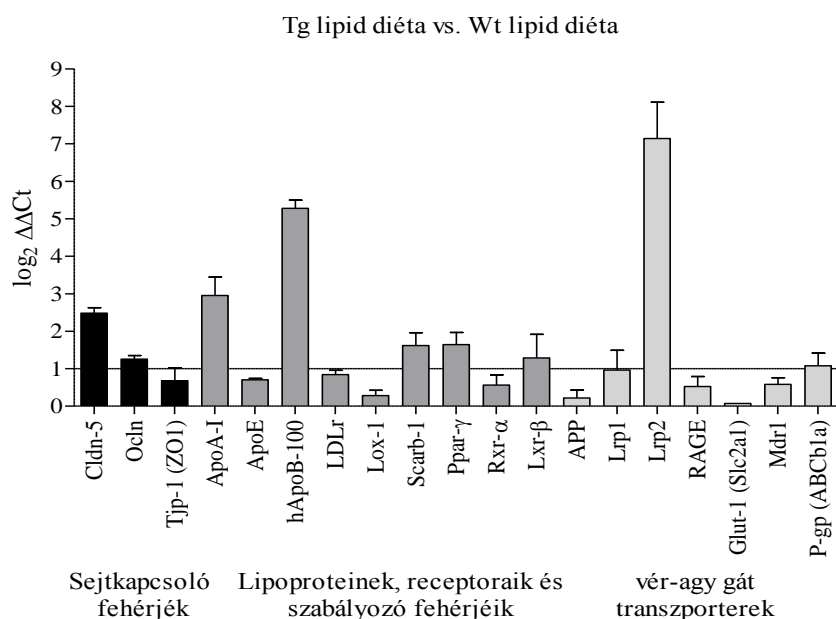
19. ábra: Különböző agyterületek transzcelluláris (Evans-kék) permeabilitása (átlag±SEM, N=6 csoportonként, statisztikai próba: kétszemponos, ill. egyszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt) 4 hetes lipidgazdag (61%) diétát követően. Az ábrán látható jelölések magyarázata a következő: \*, az egyes csoportok közötti különbség szignifikáns.

#### 4.9. Kortikális mikroér frakció génexpressziós vizsgálata QRT-PCR-val

Az *in vivo* permeabilitási eredmények értelmezéséhez izolált agyi mikroereken végzett génexpressziós vizsgálat vitt közelebb. A mikroerek izolálása és a további *in vitro* kísérletek dr. Deli Mária és munkatársai segítségével történtek.

Az első kísérletben a lipid diéta génexpresszióra gyakorolt hatására voltunk kíváncsiak, Wt és Tg egerek agyi mikroér frakciójában (20. ábra). Olyan gének kifejeződését vizsgáltuk, amelyek a sejt-sejt közötti kapcsolatokban (claudin-5, occludin, ZO1), a lipoproteinek transzportjában és szabályozásában (ApoA-I, ApoE, ApoB-100, LDLR, LOX1,

Scarb1 (HDLr), Ppar- $\gamma$ , RXR- $\alpha$ , LXR- $\beta$ ), valamint a vér-agy gáton keresztüli transzport folyamatokban (LRP1, LRP2, RAGE, Glut1, Mdr1, P-gp) játszanak fontos szerepet. Legnagyobb génexpresszió növekedést az Lrp2 és az ApoB-100 gének esetén tapasztaltuk (20. ábra). Az LRP2 A $\beta$  influx transzporterként működik, A $\beta$ -át szállít a perifériáról az agyba. Hasonlóan, de kisebb mértékben emelkedett a Cldn-5, az ApoA-I, a Scarb1 (HDLr), a PPAR- $\gamma$  és a LXR- $\beta$  gének szintje (20. ábra) is. A Cldn-5 relatív expressziójának fokozódása lipidgazdag diéta hatására magyarázatul szolgál arra, hogy miért nem tapasztaltunk paracelluláris permeabilitás fokozódást korábbi kísérletünkben. A szoros kapcsolatok fehérjéi funkcionálisan épek, ezért megakadályozzák a Na-fluoreszcein fokozott parenchimális penetrációját. A lipid metabolizmust szabályozó LXR- $\beta$ , PPAR- $\gamma$ , illetve ApoB és ApoA-I relatív expressziója lipid diéta hatására (20. ábra) mérsékelten növekszik Tg-ban a Wt-hoz képest, ami a Scarb1 (HDLr) növekedését vonja maga után. Mindezek fokozott celluláris és parenchimális koleszterin effluxra utalnak.

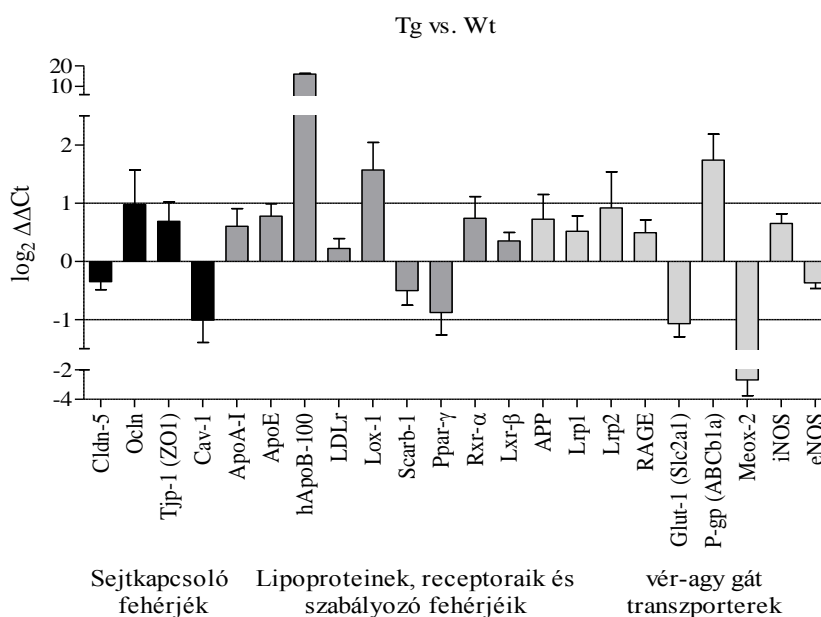


20. ábra: 4 hétig lipidgazdag diétán tartott egerek (Wt és Tg, N=6-6) agyi mikroér génexpressziós mintázata (átlag $\pm$ SD).

A második kísérletben a normál tápon tartott Wt és Tg állatok génexpressziós különbségeire fókuszáltunk (21. ábra). Azt találtuk, hogy Tg állatok mikroereiben az ApoB-100 igen nagymértékben expresszálódik, amit eddig mások nem mutattak ki. Kisebb mértékben növekedett a LOX1 és a P-gp mRNS mennyisége Tg állatokban (21. ábra) a Wt-hoz képest. A P-gp növekedése összhangban áll azzal, hogy az előző kísérletben nem



tapasztaltunk jelentős transzcelluláris permeabilitás fokozódást a Wt-hoz képest. A LOX1 magasabb szintje pedig azzal függhet össze, hogy az agyi erekben is atherosclerotikus folyamatok indulhattak el. Ezzel párhuzamosan a Caveolin-1 (Cav-1), a Glut1, a MEOX2 és a PPAR- $\gamma$  gének kifejeződésének csökkenése figyelhető meg (21. ábra). A Cav-1 csökkenése a ZO-1 (Tjp-1) és Occludin (Occludin) növelésén keresztül csökkenti a paracelluláris permeabilitást, ami magyarázza, hogy az *in vivo* kísérlet során Tg állatokban miért nem tapasztaltunk fokozott paracelluláris permeabilitást a Wt-hoz képest. A MEOX2 szintjének csökkenése (21. ábra) általában agyi hipoperfúzió, gyulladás, fokozott szabadgyök termelődés és neuronális diszfunkció során mutatható ki. A neurodegeneratív folyamatok jelenlétét Tg egereinkben elektrofiziológiával, dendrittüske-sűrűség vizsgálattal és szövettani festéssel (Fluoro-Jade C) igazoltuk. A PPAR- $\gamma$  a lipid tárolást, illetve a glükóz metabolizmust szabályozza. Vele párhuzamosan a Glut1 is csökkenést mutat a Wt-hoz képest.



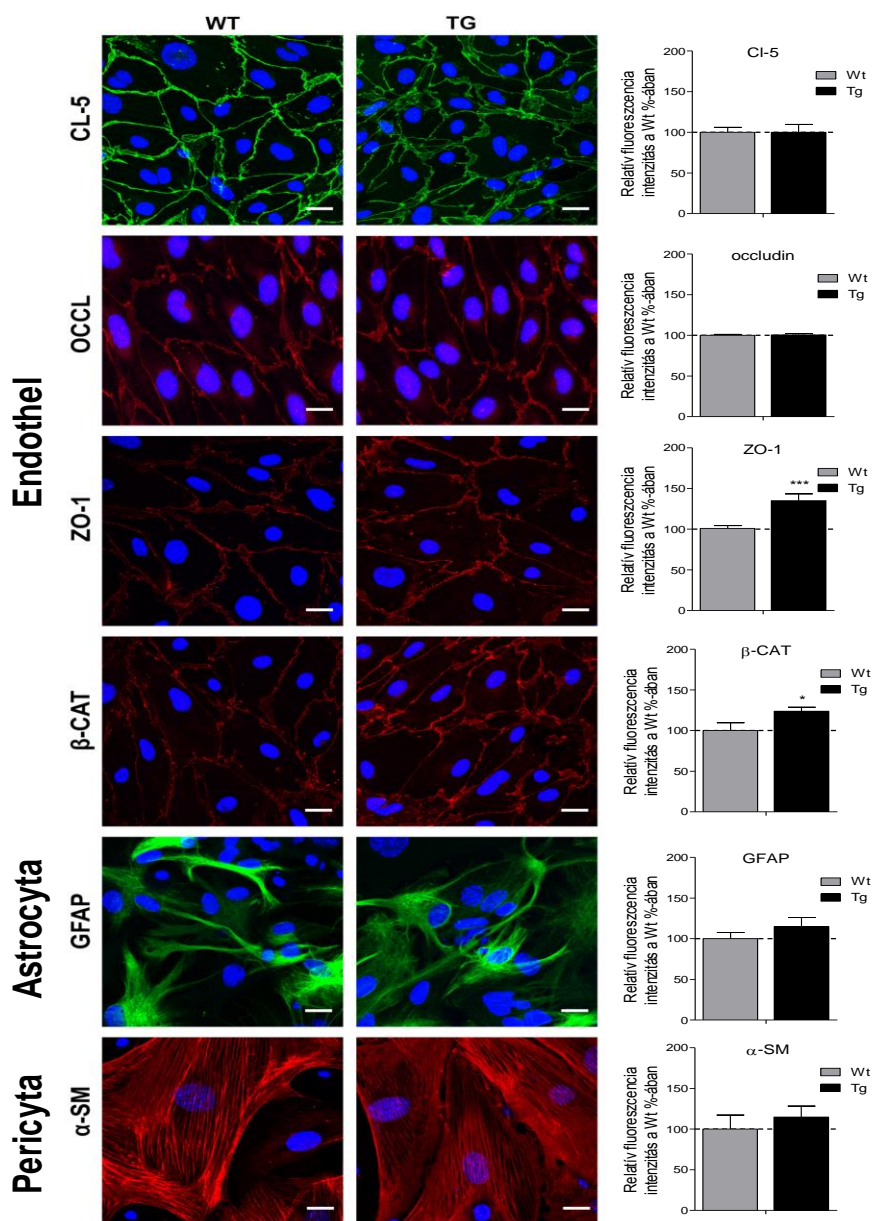
21. ábra: Normál tápon tartott egerek (Wt és Tg, N=6-6) agyi mikroér génexpressziós mintázata (átlag±SD).

4. Hogyan modellezhetjük a hiperlipidémia hatására *in vivo* kialakult endothel diszfunkciót *in vitro* a vér-agy gát izolált primer sejttípusain (endothel, astrocyta, pericyta)?

#### 4.10. Immuncitokémia primer endothelsejteken, astrocytákon és pericytákon

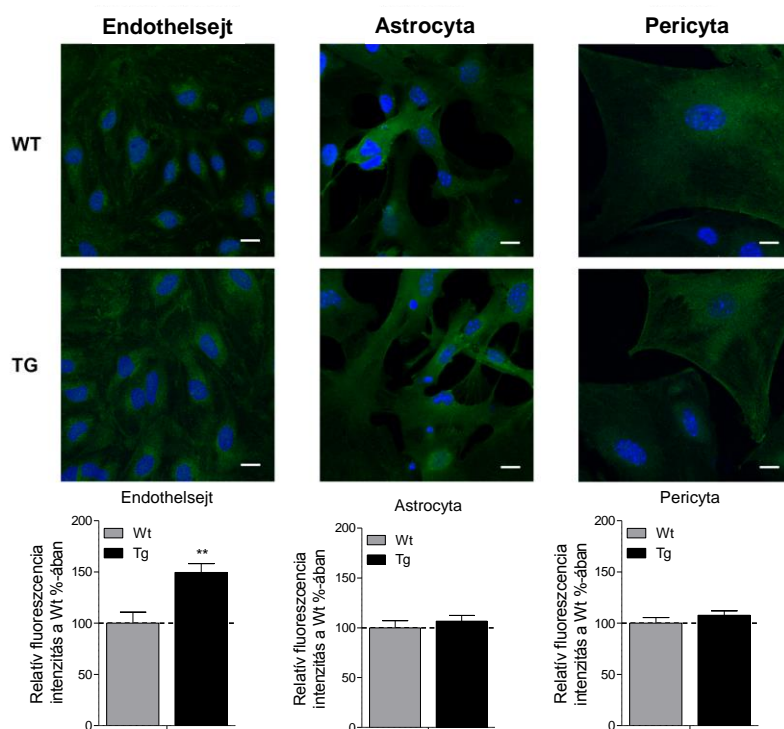
Irodalmi adatok szerint az ApoB-100-fehérje normál körülmények között nem fordul elő az agyban. *De novo* szintézisét eddig még senki sem igazolta. Annyit tudunk biztosan,

hogy nem képes átjutni az ép vér-agy gáton. Löffler és mtsai. (2013) azonban hApoBxAPP transzgenikus egerekben az ApoB-100 perivaszkuláris akkumulációját figyelték meg a cortex és hippocampus leptomeningeális ereinek környezetében. hApoB transzgenikus egerekben az agy mélyebben elhelyezkedő területein (pl. thalamus) a kapillárisok mutatnak ApoB-100 immunreaktivitást (6. függelék). Ez összhangban áll azzal, hogy izolált kortikális mikroér preparátumokban az ApoB nagymértékű expresszióját tapasztaltuk.



22. ábra: A vér-agy gát primer sejtípusainak morfológiai és molekuláris fenotipizálása (relatív fluoreszcencia intenzitás a Wt%-ában, átlag±SEM, Nagyítás: 630x, Mércse: 15um). \* Tg szignifikáns a Wt-hoz képest ( $p < 0,05$ , ill.  $p < 0,001$ , statisztikai próba: egymintás T-próba).

Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy a fokozott ApoB-100 jelenlét a vér-agy gát mely sejttípusához is köthető pontosan? A kérdés megválaszolásához primer endothelsejt, astrocyta és pericyta kultúrákat hoztunk létre, amelyeken immuncitokémia (ICC) segítségével vizsgáltunk. Első lépésben az izolált sejtek morfológiai és molekuláris fenotípusát ellenőriztük Ocln, Cldn-5, ZO1,  $\beta$ -catenin és  $\alpha$ -SM ellenanyagok segítségével (22. ábra). A vizsgált markerek közül a fluoreszcencia intenzitás értékek alapján a ZO1 és  $\beta$ -catenin mennyisége szignifikánsan magasabbnak adódott Tg endothelsejtekben a Wt-hoz viszonyítva ( $p_{\beta\text{-cat.}} < 0,05$ ;  $p_{\text{ZO1}} < 0,001$ ) (22. ábra). Miután meggyőződünk róla, hogy a kultúrák az egyes sejttípusokra jellemző morfológiát mutatják, és igazoltuk a sejtspecifikus markerek jelenlétét, ApoB-100 immunfestést végeztünk (23. ábra).

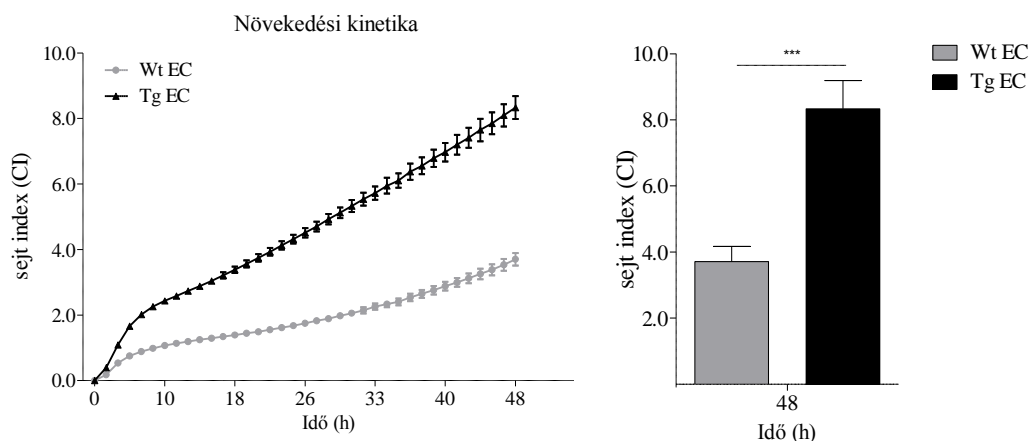


23. ábra: ApoB-100 ICC primer agyi endothelsejteken, pericytákon és astrocytákon (relatív fluoreszcencia intenzitás a Wt%-ában, átlag $\pm$ SEM, Nagyítás: 630x, Mérce: 15 $\mu$ m). \* Tg szignifikáns a Wt-hoz képest ( $p < 0,01$ , statisztikai próba: egymintás T-próba).

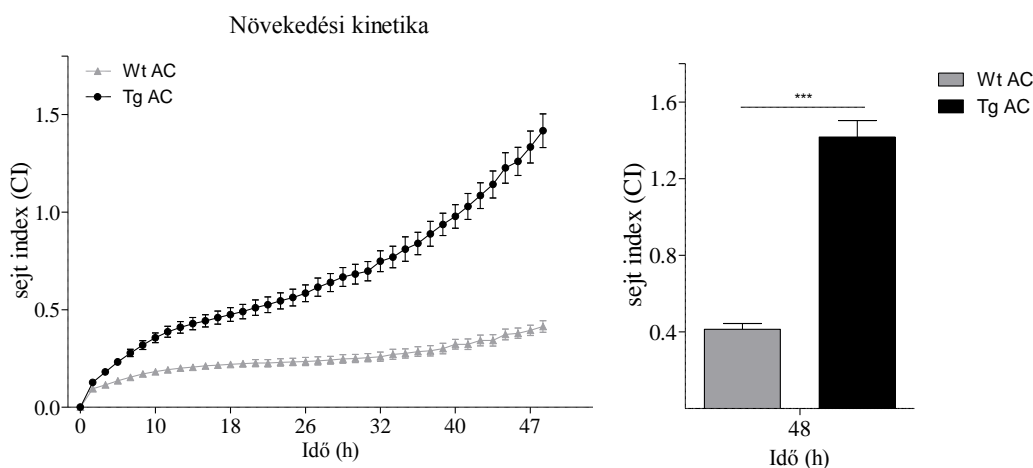
Az találtuk, hogy az ApoB-100 fehérje a Wt-ú állatokból származó valamennyi sejttípusban (endothel, astrocyta, pericyta) megtalálható, ami korábban nem volt ismert. Az ApoB-100 fehérje mennyisége, a fluoreszcencia intenzitás értékek alapján, a Tg endothelsejtekben szignifikánsan nagyobb ( $p < 0,01$ ), mint a Wt-ú sejtekben (23. ábra).

#### 4.11. Primer sejtek növekedési kinetikája

A primer sejtek (endothel, astrocyta) növekedési kinetikáját valós idejű sejtanalizáló rendszerrel (ACEA Biosciences, Inc. xCELLigence RTCA-SP) monitorozva azt figyeltük meg, hogy a Tg állatokból származó sejtek szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) gyorsabban nőttek a Wt-ből izoláltakhoz képest, az azonos kiindulási sejtszámok ellenére is (24-25. ábra).



24. ábra: Primer endothelsejtek (EC) növekedési kinetikája (átlag $\pm$ SEM).\*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,001$ , statisztikai próba: egyszempontos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt)

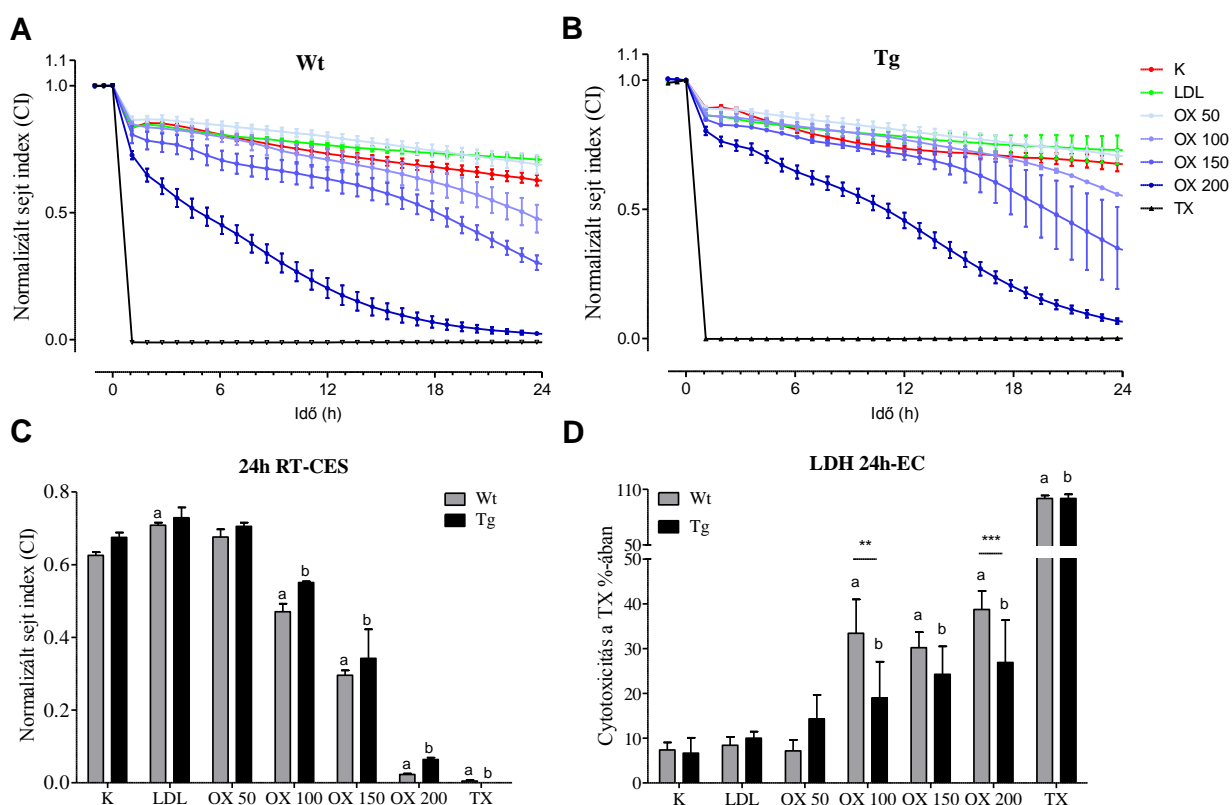


25. ábra: Primer astrocyták (AC) növekedési kinetikája (átlag $\pm$ SEM).\*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,001$ , statisztikai próba: egyszempontos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt)

#### 4.12. Valós idejű viabilitás és toxicitás (LDH) vizsgálatok primer sejteken

A primer sejtekkel végzett *in vitro* kísérleteket (ICC, növekedés, viabilitás, toxicitás, ROS mérés) dr. Deli Mária csoportjával együttműködésben végeztük.

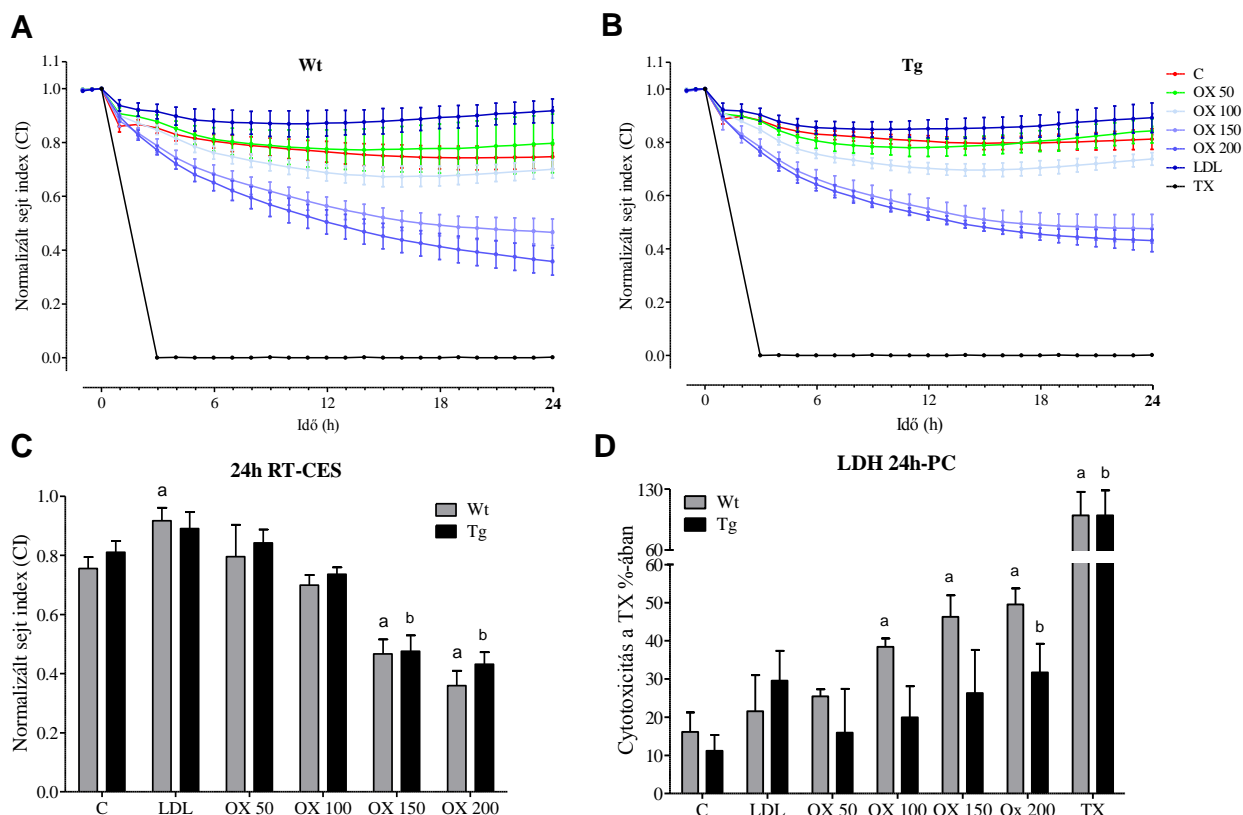
A mikroér génexpressziós vizsgálat során tapasztalt magas LOX1 (oxLDLr) szint arra ösztönzött bennünket, hogy megvizsgáljuk a vér-agy gát sejteinek oxLDL-re adott reakcióját. A primer sejteket oxLDL-lel (50-200 ug/ml) kezelve azt tapasztaltuk, hogy az egyes sejttípusok eltérő érzékenységgel rendelkeztek az oxLDL toxikus hatásával szemben. Az astrocyták bizonyultak a legérzékenyebbnek (28. ábra), majd az endothelsejtek (26. ábra), legkevésbé pedig a pericyták (27. ábra) voltak érzékenyek az oxLDL károsító hatására. Az E-plate-en kapott eredményeket (26., 27., 28. A, B, C ábra) LDH teszttel erősítettük meg (26., 27., 28. D ábra). Az alábbi ábrákon a Wt (26. A ábra), illetve Tg endothelsejtek (26. B ábra), pericyták (27. A, B ábra) és astrocyták (28. A, B ábra) 24 órás viabilitási és toxicitási értékeit (26., 27., 28. D ábra) láthatjuk.



26. ábra: 24 órás oxLDL kezelés hatása (Wt: A, Tg: B) primer endothelsejtek (EC) viabilitására (átlag $\pm$ SD). C: E-platen mért viabilitás, D: LDH teszttel mért cytotoxicitás. Az ábrán látható jelölések magyarázata: a, Wt kontrollhoz képest szignifikáns; b, Tg kontrollhoz képest szignifikáns, \*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , statisztikai próba: kétszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt).

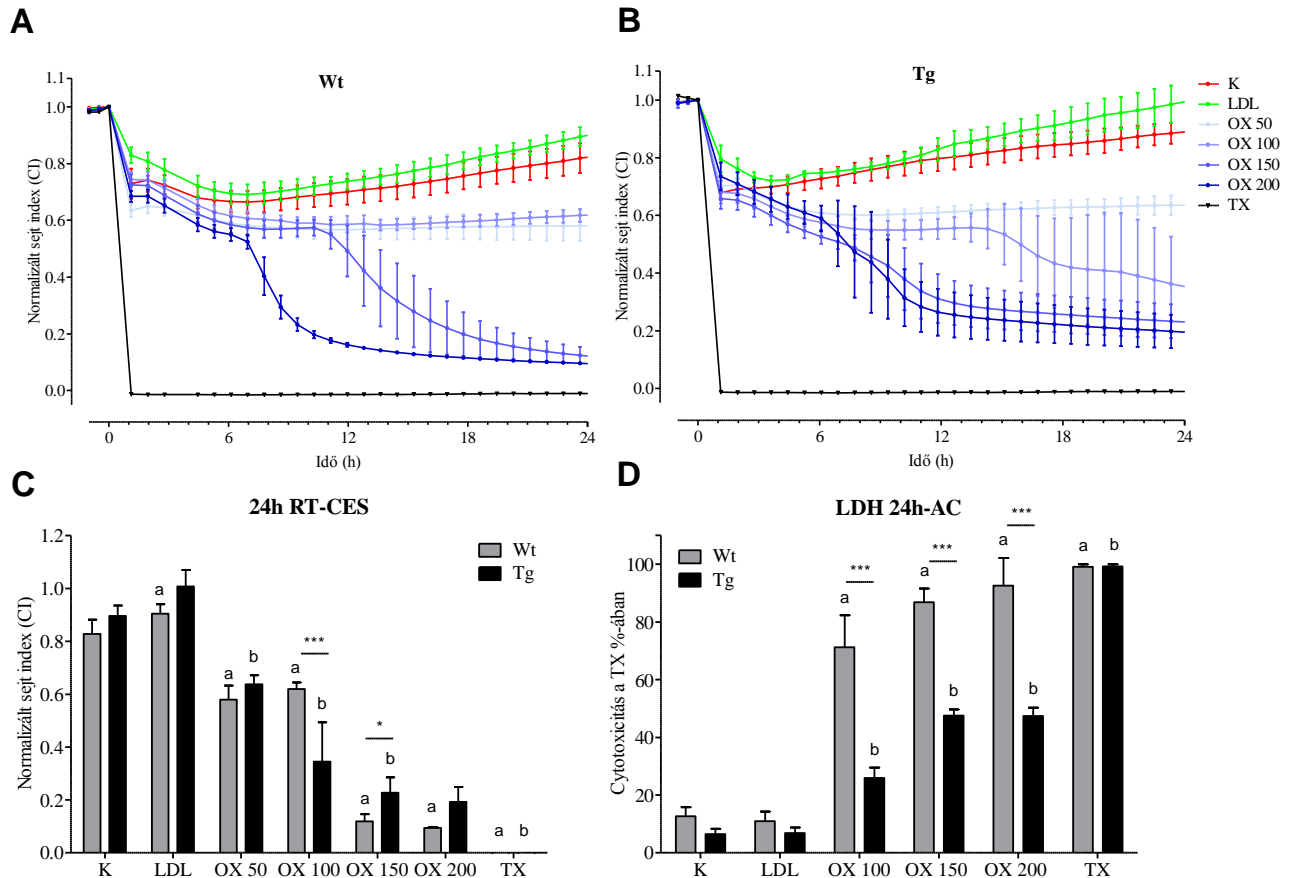
Endothel tenyészetek esetén dózisfüggő oxLDL hatást láttunk mind a viabilitásban (26. A, B, C ábra), mind pedig a toxicitásban (26. D ábra). Az LDH teszt során megfigyeltük,

hogy az oxLDL károsító hatása a Wt sejteken sokkal kifejezettebben jelentkezik, az oxLDL szignifikánsan toxikusabb a Wt sejtekre, mint a Tg sejtekre (26. D ábra).



27. ábra: 24 órás oxLDL kezelés hatása (Wt: A, Tg: B) primer pericyták (PC) viabilitására (átlag $\pm$ SD). C: E-platen mért viabilitás, D: LDH teszttel mért cytotoxicitás. Az ábrán látható jelölések magyarázata: a, Wt kontrollhoz képest szignifikáns; b, Tg kontrollhoz képest szignifikáns, (statisztikai próba: kétszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt).

Primer pericyta tenyészeteken is az oxLDL dóziszfüggő viabilitás csökkentő hatását tapasztaltuk (27. A, B, C ábra), amely csökkenés nem olyan kifejezett, mint az endothelsejteknél tapasztalt. A membránkárosodás (27. D ábra) azonban nagyobb mértékű, mint amit endothelsejtek esetén láttunk. Valószínűleg, a pericyták membránjának nagyobb oxLDL-érzékenysége következtében figyeltünk meg az endothelsejteknél nagyobb mértékű membránkárosító hatást az LDH teszt során (27. D ábra).



28. ábra: 24 órás oxLDL kezelés hatása (Wt: A, Tg: B) primer astrocyták (AC) viabilitására (átlag $\pm$ SD). C: E-platen mért viabilitás, D: LDH teszttel mért cytotoxicitás. Az ábrán látható jelölések magyarázata: a, Wt kontrollhoz képest szignifikáns; b, Tg kontrollhoz képest szignifikáns, \*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva. ( $p < 0,001$ , statisztikai próba: kétszemponos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt).

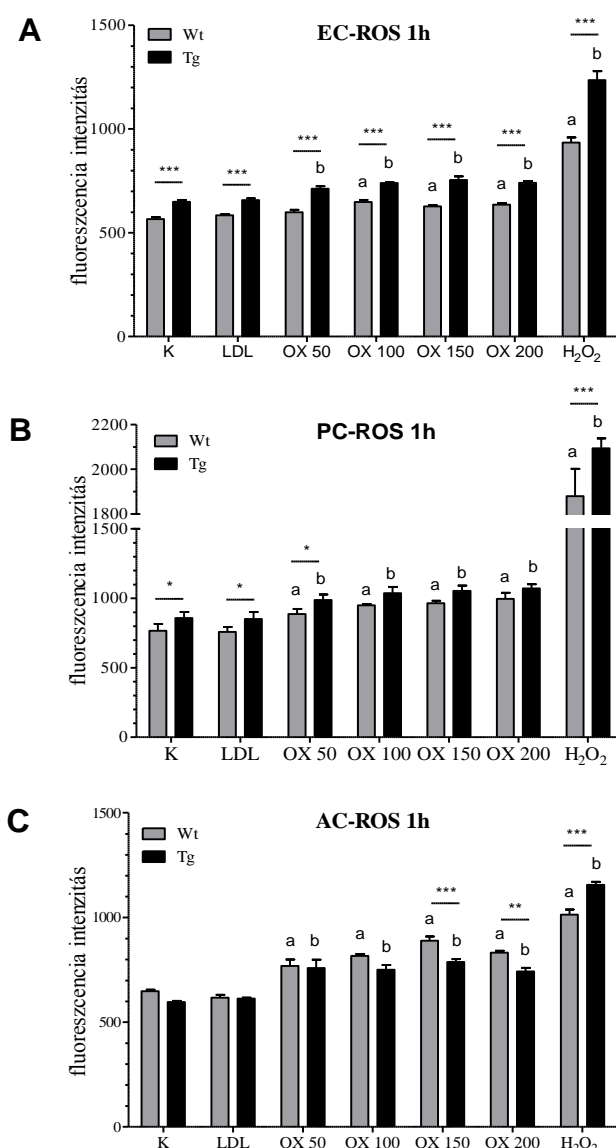
Az oxLDL dóziszfüggő viabilitás csökkentő hatása, a vizsgált három primer sejttípus közül, a primer astrocyta tenyészeteken a legkifejezettebb (28. A, B, C ábra). Azt tapasztaltuk, hogy oxLDL kezelés hatására igen erős membránkárosodás jön létre ezekben a sejtekben (28. D ábra). Érdekes, hogy a Wt sejtekben szignifikánsan nagyobb a károsodás mértéke, mint a Tg sejtekben (28. D ábra).

#### 4.13. In vitro ROS mérés primer sejteken

Ebben a kísérletben primer sejtek ROS termelését vizsgáltuk 1 órás oxLDL kezelés hatására fluoreszcens indikátor segítségével. Mindhárom sejttípusra jellemző egy bazális ROS termelés, amely oxLDL kezelés hatására megváltozik (29. ábra).



A vizsgálat során azt kaptuk, hogy a Tg endothelsejtek (29. A ábra) és pericyták (29. B ábra) bazális ROS termelése szignifikánsan nagyobb a Wt-ú sejtekéhez képest ( $p_{Tg_{EC}} < 0,001$ ;  $p_{Tg_{PC}} < 0,01$ ), míg astrocyták (29. C ábra) esetén a két genotípusú sejt ROS termelése szignifikánsan nem különbözött. A pozitív kontrollként használt  $H_2O_2$  hatás mértéke is eltérő az egyes sejtípusokon: pericytában (29. B ábra) és endothelben (29. A ábra) magasabb ROS termelést indukál, mint astrocytában (29. C ábra), jelezvén, hogy a sejtek egyedi ROS termelő képessége eltérő.



29. ábra: 1 órás oxLDL kezelés hatása (Wt: szürke oszlop, Tg: fekete oszlop) primer sejtek ROS termelésére (átlag $\pm$ SD). A: endothelsejtek (EC), B: pericyták (PC), C: astrocyták (AC) fluoreszcencia intenzitás értékei. Az ábában látható jelölések magyarázata: a, Wt kontrollhoz képest szignifikáns; b, Tg kontrollhoz képest szignifikáns; \*, Tg szignifikáns a Wt-hoz viszonyítva. ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , statisztikai próba: kétszemponyos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt).



Méréseink szerint az oxLDL kezelés Tg sejtekben (29. A, B ábra) következetesen nagyobb ROS termelést eredményez, mint Wt sejtekben (kivéve: astrocyta, 29. C ábra). A kezelés hatására a Tg endothelsejtek (29. A ábra) ROS termelése szignifikánsan megemelkedik a Wt-hoz képest ( $p_{\text{oxLDL}} < 0,001$ ), míg pericytákban (29. B ábra) ez csak trendként jelenik meg. Astrocytáknál (29. C ábra) fordított helyzet adódik, a Wt sejtek termelnek szignifikánsan több ROS-t nagy dózisú oxLDL hatására.

## 5. Diszkusszió

Csoportunk és mások is igazolták már korábban, hogy az ApoB-100 overexpressziója transzgenikus egerekben a trigliceridek tartósan magas szintjéhez vezet a szérumban, vagyis hipertigliceridémiát indukál (Csont és mtsai. 2007, Callow és mtsai. 1994, McCormick és mtsai. 1996). A magas szérumtriglicerid-szint mellett csökkent HDL-, valamint emelkedett LDL- és összkoleszterinszint jellemző. Mivel az injektált transzgén a teljes hosszúságú humán *APOB* gént (43 kb) a környező genomi szekvenciákkal (19 kb 5' és 14 kb 3') együtt tartalmazta (1. függelék), a hApoB-100-fehérje kifejeződése teljesen azonos az endogén fehérjéével: a májban, a vékonybélben és a szívben termelődik, ektopiás expresszió nem állapítható meg (2. függelék). Ismereteink szerint az ApoB-100-fehérje fiziológiás körülmények között nem található meg az agyban (Skinner 2002, Lajtha 2009). Ezzel szemben jelen vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy alacsony szinten ugyan, de az agyi endothelsejtekben, astrocytákban és pericytákban is megtalálható. Mivel mRNS vizsgálatokat ezekből a szövetekből nem végeztünk, így nem tudjuk, hogy *de novo* szintézisről van-e szó, vagy a fehérjék transzport útján kerültek a sejtekbe. A szakirodalom álláspontja egységes a tekintetben, hogy tudni véli az ApoB és ApoE tartalmú lipoproteinek nem képesek átjutni a vér-agy gáton, jóllehet az agyi endothelsejtek LDLr-kat is expresszálnak (Skinner 2002, Lajtha 2009, Gosselet és mtsai. 2009). Ez valószínűleg így is van egészséges, ép vér-agy gát esetén. Ezzel szemben kísérleteinkben erőteljes ApoB immunreaktivitást figyeltünk meg a Tg egerek agyszövetében, amit később kortikális homogenátumokon western blot segítségével is megerősítettünk. Löffler és mtsai. (2013) is hasonló eredményre jutottak ApoB Tg egereken folytatott vizsgálataik során. Tanulmányukban az ApoB kortikális akkumulációját, illetve extravazációját figyelték meg APPswe x ApoB kettős transzgenikus egerek agykérgében, illetve a hippocampus leptomeningeális ereinek közvetlen környezetében (6. függelék). ApoB transzgenikus egerekben a kisebb kapillárisok és venulák is immunreaktivitást mutattak. Velük egyetértésben feltételezzük, hogy az ApoB parenchimális jelenléte az agyi kapilláris endothelsejtek diszfunkciójával magyarázható. A tartós hiperlipidémia atherosclerotikus elváltozásokhoz vezet, amely a cerebrovaszkuláris rendszert károsítva a vér-agy gát diszfunkcióját eredményezheti (Napoli és Palinski 2005, Jellinger 2007, Zlokovic 2011). Hipotézisünk konzisztens azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy indukált ischemia esetén az ApoB Tg egerek csökkent kapilláris denzitással, ezt kompenzálóan pedig nagyobb kapilláris átmérővel rendelkeznek (Süle és mtsai. 2009) a Wt-hoz képest.

A cerebrális lipidmetabolizmus alapelemeit vizsgálva azt találtuk, hogy Tg egerek agyszövetében, illetve agykérgi mintáiban az ApoE és LDLr receptor mennyisége szignifikánsan magasabb, míg az ApoA-I mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a Wt-hoz képest. Az ApoE és az LDLr mennyiségének növekedése fokozott celluláris koleszterin metabolizmusra utal. Az ApoE az agyban legnagyobb mennyiségben előforduló lipoprotein, *de novo* szintetizálódik, mivel a vér-agy gáton keresztül való ájutása gátolt (Skinner 2002, Lajtha 2009). Főként astrocyták termelik, de sérülés hatására neuronok és mikroglia is szekretálják, így az idegi regenerációban is részt vesz. Legfontosabb szerepe azonban a koleszterin és a foszfolipidek szintézise, illetve ezek neuronokhoz történő eljuttatása, amiben az LDLr és az ABC transzporterek vannak segítségére (Wang és Eckel 2014). A szintézis mellett komoly szerepe van a hatékony agyi koleszterin effluxban is, melynek során a felesleges koleszterint a cerebrospinális folyadékba juttatja. Az ApoA-I nem szintetizálódik a központi idegrendszerben, azt azonban tudjuk, hogy képes átjutni a vér-agy gáton (Skinner 2002, Lajtha 2009). Az agyban betöltött szerepével kapcsolatosan számtalan ellentmondásos eredmény született: egyesek protektív hatását igazolták demenciában, míg mások nem találtak közvetlen összefüggést a neurodegeneráció és az ApoA-I szint között. Lewis és mtsai. (2010) AD x ApoA-I transzgenikus egerekkel végzett kísérletei azonban egyértelműen bizonyították, hogy az ApoA-I csökkenti a cerebrális amiloid angiopathiát, a neuroinflammációt, az astrocyta és mikroglia aktivációt, sőt a kognitív funkciókat is javítja. Mindezek mellett az oxidatív stresszel szemben is védőhatású. Az ApoA-I, illetve az ApoA-I-HDL-partikulumok képesek megvédeni a hippocampális neuronokat az Alzheimer-kór okozta oxidatív stresszel és neurodegenerációval szemben (Paula-Lima és mtsai. 2009). Kimutatták, hogy AD-os betegekben az ApoA-I szérumszintje alacsony, mennyiségének csökkenése pedig korrelál a betegség súlyosságának fokozódásával (Raygani és mtsai. 2006). Az általunk tapasztalt ApoA-I csökkenés a cerebrális erekben hozzájárulhat a ROS endothelkárosító hatásának csökkent tolerálásához.

Kimutattuk továbbá, hogy a Tg egerek agyában a Tau-fehérje már fiatal korban számos oldalláncán hiperfoszforilálódik (Ser<sup>262, 199/202, 396, 404</sup>) és neurofibrilláris kötegeket képez. Mivel kísérletünkben a Tg és Wt-ú egerek a natív (foszforilálatlan) Tau mennyiségében szignifikánsan nem különböztek egymástól, a tapasztalt különbségek a foszforiláció mértékéből adódtak. Az általunk vizsgált foszforilált formák a Kimura és mtsai. (1996), illetve Augustinac és mtsai. (2002) által morfológiailag leírt és foszforilált Tau-formákkal részletesen jellemzett neurofibrilláris degeneráció valamennyi NFT fázisában megjelennek. Az általunk immunhisztokémiával detektált TaupSer<sup>404</sup> mintázat a

neurofibrilláris degeneráció extra-neuronális NFT fázisát reprezentálja, az neurofibrilláris kötegeket tartalmazó sejtek elhalnak és már csak az oldhatatlan „szellemkötegek” (ghost tangle) láthatóak az agyszövetben. A Tg egerekben tapasztalt neurofibrilláris degeneráció azonban nem jár együtt A $\beta$  plakk képződéssel. Ez illeszkedik a humán mutáns (Götz és Ittner 2008) és egér Tau (Adams és mtsai. 2009) Tg egérmodellekben megfigyelt neurodegenerációs képbe. Ezekben a modellekben egyáltalán nincs amiloid plakk képződés. Jóllehet az APP megnövekedett mennyiségét tapasztaltuk, ez azonban nem okozott A $\beta$  túltermelődést, ami részben a megnövekedett ApoE mennyiségnek is köszönhető, ami aktívan részt vesz az A $\beta$  molekulák eltávolításában (Verghese és mtsai. 2013, Huang 2011). A neurofibrilláris degeneráció a mikrotubulushálózat dezorganizációját, szétesését okozza, ami az axonális transzportfolyamatok és a szinaptikus transzmisszió károsodásához, végül pedig az idegsejtek elhalásához vezet (Augustinac és mtsai. 2002, Buée és mtsai. 2000).

A hipertrigliceridémia által okozott funkcionális és morfológiai elváltozások tendenciózan csökkent dendrittüskeszámban és kiterjedt neuronális apoptózisban nyilvánultak meg. ApoB-100 Tg egerekben szignifikánsan több apoptotizált idegsejtet detektáltunk a kéreg és a hippocampus területén, mint a Wt-ban, ami összecseng Bereczki és mtsai. (2008) eredményeivel. Továbbá a hippocampális dendrittüskék hossza és száma is jelentősen lecsökkent Tg állatokban a Wt-hoz képest. A morfológiai elváltozások által okozott funkcionális zavarokat behatóbban vizsgálva a preszinaptikus funkció, vagyis a rövidtávú szinaptikus plaszticitás károsodását (csökkent PPF arány), emellett pedig a tanulási és memóriefolyamatok romlását (csökkent LTP) mutattuk ki. Mindezek összhangban vannak Farr és mtsai. (2008) eredményeivel, akik igazolták, hogy az elhízás és a hipertrigliceridémia a kognitív funkciók romlásához vezet. A trigliceridek ugyanis károsítják a hippocampusban az LTP NMDA-függő komponensét, ami csökkent memória és tanulási funkciókat eredményez. A szérumtriglicerid-szint szelektív csökkentésével a funkciók javíthatók. Ramirez és mtsai. (2011) ApoB-t overexpresszáló, de LDLr K.O. Tg egerekben csökkent lokomotor aktivitást, az epizódikus memória romlását és a mikrotubulus-hálózat dezintegrációját mutatták ki. Löffler és mtsai. (2013) szintén a memóriefunkciók károsodását mutatták ki ApoB Tg egerekben Morris-féle vízi labirintus és kontextuális félelem kondicionálási tesztekben. Az LTP és a hosszútávú szinaptikus hatékonyság csökkenés (LTD) molekuláris működése PKC- $\gamma$ -át igényel (Saito és Shirai 2002). A PKC- $\gamma$  deficiens egerek módosított LTP-t mutatnak és enyhe térbeli és kontextuális tanulási zavarral bírnak (Abeliovich és mtsai. 1993 a, b). Ezen korábbi megfigyelésekkel egyezően Tg egerekben a PKC- $\gamma$  mennyiségét mintegy fele akkora találtuk, mint a Wt-ban.

A tapasztalt morfológiai és funkcionális elváltozások arra sarkalltak minket, hogy megvizsgáljuk a vér-agy gát hiperlipidémia általi érintettségét is. Azt tapasztaltuk, hogy a Tg egerek vér-agy gátja kismolekulákra (Na-fluoreszcein), habár nem szignifikánsan, de átjárhatóbb a Wt-hoz képest. Ezzel szemben a lipid diéta egyik genotípusban sem okozott paracelluláris permeabilitás fokozódást egyik vizsgált agyterületen sem. Nagy mólsúlyú anyagok (Evans-kék) átjárhatóságának vizsgálatakor viszont éppen fordított eredményt kaptunk. A két genotípus normál tápon tartva nem különbözött szignifikánsan egymástól, permeabilitásban, (kivéve a szaglógumó területét) azonban a lipid-diéta hatása szinte minden agyterületen tettenérhető volt: erősen és szignifikánsan fokozta a vér-agy gát permeabilitását. Lipid-dús diéta hatására szignifikáns permeabilitás fokozódást mutattunk ki a Tg mintákban a Wt-hoz képest a kéreg, a középagy és a szaglógumó területén. Tehát a genotípus önmagában nem, csak a lipid diétával kölcsönhatásban fokozta a transzcelluláris permeabilitást. Mindez összhangban van Kalayci és mtsai. (2009) által koleszterinnel etetett patkányokban leírt Evans kék permeabilitás fokozódással. Kimutatták, hogy a koleszterin etetés fokozza az oxLDL képződését, a lipidek peroxidációját, csökkenti az endothel NO termelését és fokozza a TNF- $\alpha$  mennyiségét. Acharya és mtsai. (2013) sertésmodellben igazolták a hiperlipidémia és a diabetes vér-agy gát permeabilitást fokozó hatását. A vér-agy gát megnyílással párhuzamosan megnövekedett A $\beta$  felhalmozódást mutattak ki, amely elsősorban a kéreg piramissejtjeit érintette.

A mikroér génexpressziós vizsgálat eredménye némiképp magyarázattal szolgált a tapasztalt permeabilitási eredményekre. Lipidgazdag diéta hatására Tg mintákban fokozódott a Cldn-5 és kis mértékben az Ocln, illetve a P-gp mennyisége, ami a sejtkapcsolatok fehérjéinek épségére utal, ami magyarázattal szolgál arra, hogy nem tapasztaltunk paracelluláris permeabilitás fokozódást egyik vizsgált agyterületen sem. Ugyanakkor a koleszterin metabolizmusban és transzportban szerepet játszó lipoproteinek és receptoraik (ApoA-I, ApoB, SR-1, LXR- $\beta$ , PPAR- $\gamma$ ) expressziójának mérsékelt növekedését tapasztaltuk. Mindezek a változások a celluláris és szöveti koleszterin efflux hatékonyságának fokozódása, valamint a lipidek által kiváltott oxidatív stressz rosszabb tolerálásának (ApoA-I) irányába hatnak. Az ApoB mennyiségének fokozódása a kapillárisokban a vér-agy gát szivárgására utal. Ha azonban csak a transzgén által okozott hatásokra fókuszálunk, akkor azt mondhatjuk, hogy Tg egerek mikroereiben az ApoB, a LOX1, az LRP2 és P-gp nagy mennyiségben expresszálódik. A LOX1 megnövekedett mennyisége a mikroerekben fokozott cerebrovaszkuláris lipidperoxidációra, az atherosclerosis következtében fellépő oxidatív károsodásra utal. A P-gp és az Ocln gátolja idegen anyagok bejutását, illetve csökkenti a

paracelluláris permeabilitást. A MEOX2, Cav-1 és Glut1 expressziója ezzel szemben csökkenést mutat Tg egerekben a Wt-hoz képest. A Cav-1 csökkenése a ZO-1 (Tjp-1) és az Occludin növelésén keresztül csökkenti a paracelluláris permeabilitást (Zlokovic 2008), ami magyarázza, hogy miért nem tapasztaltunk fokozott paracelluláris permeabilitást a Wt-hoz képest. A MEOX2 szintjének csökkenése agyi hipoperfúziót és hipoxiát jelez, ami gyulladáshoz, fokozott szabadgyök termelődéshez, végül neuronális diszfunkcióhoz vezet (Zlokovic 2011, Marques és mtsai. 2013), amit elektrofiziológiával, a dendrittüske-sűrűség vizsgálatával és szövettani festéssel is igazoltunk. Hipoxia hatására a MEOX2 mennyisége csökken, míg a MYOCD és a SRF mennyisége nő (Zlokovic 2011). A MEOX2 csökkenése kapilláris regressziót, hipoperfúziót, gyulladást és szinaptikus károsodást eredményez. Emellett csökkenti az A $\beta$  clearance-ét és fokozza a RAGE expresszióját, ezáltal a ROS termelődést és a gyulladást. A MYOCD és SRF növekedése a vaszkuláris simaizomsejtek hiperkontraktilis fenotípusát eredményezi, ami cerebrális amiloid angiopathiát, hipoperfúziót és vér-agy gát-károsodást okoz (Zlokovic 2011). Klinikai tanulmányokból ismert, hogy a demenciás betegek agyában hipoperfúzió és hipoxia mutatható ki (Zlokovic 2011). A PPAR- $\gamma$  a lipid tárolást, illetve a glükóz metabolizmust szabályozza. A PPAR- $\gamma$ -val párhuzamosan a Glut1 is csökkenést mutat a Wt-hoz képest. Globális ichemia/reperfúziós modellben a PPAR- $\gamma$  védi a hippocampális neuronokat azáltal, hogy csökkenti az oxidatív stresszt és a gyulladást (Luo és mtsai. 2014).

A mikroerekben tapasztalt molekuláris változások arra ösztönöztek bennünket, megvizsgáljuk a vér-agy gát sejtjeinek viselkedését *in vitro*. Az izolált primer sejteket ApoB ellenanyaggal megfestve azt tapasztaltuk, hogy az valamennyi sejttypusban kifejeződik, amit eddig mások nem mutattak még ki. Úgy tűnik, hogy a három sejttypus közül az endothelsejtek mutatják a legnagyobb immunreaktivitást. Ezek szerint jelenléte az agyban és a mikroerekben nem feltétlenül csak perifériás eredetű, számunkra eddig ismeretlen funkcióval bírhat. A primer sejtekkel végzett munka során megfigyeltük, hogy a Tg állatokból származó tenyészetekben a sejtek szignifikánsan gyorsabban növekedtek a Wt-ú sejtekhez képest az azonos kiindulási sejtszámok és tenyésztési körülmények ellenére is. Ez valószínűleg a sejtek fokozott szérumból történő lipidfelvételével és hasznosításával magyarázható, amit az ApoB nagymértékben elősegíthet.

A Tg mikroerekben tapasztalt magas LOX1 expresszió vonalán elindulva, a sejtek oxLDL-re adott reakcióját vizsgáltuk. A LOX1-et mint az endothel diszfunkciót elindító molekulát azonosították, melyet az oxLDL aktivál. Kimutatták, hogy az atherogenezis minden fázisában részt vesz. Az endothelsejteken kívül vaszkuláris simaizomsejtek, makrofágok és

vérlemezek termelik. Bazális endotheliális expressziója alacsony, de gyulladásos és oxidatív körülmények: hipertónia, diabetes és hiperlipidémia hatására gyorsan aktiválódik. A LOX1 szignalizáció során szuperoxid képződik, ami csökkenti az eNOS aktivitását, ezáltal a NO termelődését. A fellépő oxidatív stressz és NO hiány endothel diszfunkcióhoz és atherosclerosishoz vezet (Ogura és mtsai. 2009). Az oxLDL fő toxikus komponensei az oxiszteinek, mint a 7 $\beta$ -hidroxikoleszterin (7 $\beta$ OHC) és a 7-ketokoleszterin (7ketoC). Az oxiszteinek toxikusak az endothelsejtekre, képesek beindítani az apoptózis mitokondriális és lizoszómális útját is. Steffen és mtsai. (2006) által humán köldöksínór véna endothelsejteken (HUVEC) elvégzett kísérletek szerint az oxLDL károsító hatása nagyban függ attól, hogy az LDL oxidációja milyen körülmények között megy végbe (enzimatisan vagy CuSO<sub>4</sub> hatására). Ez ugyanis jelentősen befolyásolja az oxLDL oxisztein összetételét. Az egyes oxiszteinek önmagukban és keverékekben különböző hatásúak. Kimutatták, hogy a 7 $\beta$ OHC toxikus az endothelsejtekre, míg a 7ketoC protektív a 7 $\beta$ OHC hatásával szemben. Továbbá megállapították, hogy az oxLDL hatása endothelsejteken a tiszta 7 $\beta$ OHC hatásával azonos, ami alátámasztja azt, hogy az oxLDL toxikus hatásáért a benne megtalálható oxiszteinek a felelősek. Li és mtsai. (2011) HUVEC-sejtekben oxiszteinekkel apoptózist indukáltak. Az oxLDL tehát képes átjutni a vér-agy gáton, ahol részt vesz az oxidatív stressz indukálta neuodegeneratív folyamatokban.

Egyik kísérlet sorozatunkban különböző koncentrációjú oxLDL-lel kezeltünk izolált primer endothelsejteket, pericytákat és astrocytákat. Azt tapasztaltuk, hogy az egyes sejttípusok érzékenysége igen eltérő. Legérzékenyebbnek az astrocyták és endothelsejtek, legkevésbé érzékenyek pedig a pericyták bizonyultak. Valamennyi sejttípuson az oxLDL dózisfüggő viabilitás csökkentő hatását figyeltük meg. A viabilitás csökkenést minden esetben LDH tesztel igazoltuk. Azt tapasztaltuk, hogy Wt astrocyták és endothelsejtek szignifikánsan nagyobb membránkárosodást és viabilitás csökkenést mutatnak az oxLDL hatására, mint a Tg sejtek. A Tg sejtek valamiféle előnnyel rendelkeznek a Wt sejtekhez képest. Érdekes módon a pericyták a legkevésbé érzékenyek az oxLDL-re, kismértékű viabilitás csökkenést és erőteljes membránkárosodást mutatnak. A Tg és Wt sejtek reakciója szignifikánsan ugyan nem különbözik egymástól, a Wt azonban tendenciózusan nagyobb membránkárosodást mutat, mint a Tg. Mindezek összhangban vannak Moellering és mtsai. (2002) eredményeivel, akik thoracalis aortából származó endothelsejteken az oxLDL dózisfüggő viabilitás csökkentő hatását figyelték meg. A tapasztalt jelenség megértését célozva megmértük a sejtek ROS termelését oxLDL kezelés hatására. Azt találtuk, hogy a Tg endothelsejtek és pericyták bazális ROS termelése szignifikánsan magasabb a Wt sejtekéhez

képest. OxLDL kezelés hatására Tg endothelsejtek szignifikánsan magasabb ROS termelést mutatnak a Wt sejtekhez viszonyítva, míg a pericytáknál hasonló a helyzet, de a különbség nem szignifikáns. Az astrocyták esetén pedig a Wt sejtek termelnek szignifikánsan több ROS-t a Tg sejtekhez képest. Eredményeink összhangban vannak Chang és mtsai. (2011) eredményeivel, akik cerebrális endothelsejteken megnövekedett ROS termelődést és lipidperoxidációt tapasztaltak oxLDL kezelés hatására. Fang és mtsai. (2014) HUVEC sejteket oxLDL-lel kezelve kimutatták, hogy bennük a ROS termelődés fokozódott, ami a NADPH oxidáz aktivitás növekedésének, illetve a SOD (szuperoxid-dizmutáz) és a Cat (kataláz) aktivitás csökkenésének következménye. Mindezek együttesen a NO szintézis mértékének csökkenését eredményezték. A nagymértékű ROS képződés intenzív lipidperoxidációt okozott, amit az malondialdehid (MDA) megnövekedett mennyiségével igazoltak. Hort és mtsai (2014) borjú aorta endothelsejteket (BAEC) oxLDL-lel kezelve a megnövekedett ROS és reaktív nitrogén gyök (RNS) termelődés következtében fellépő mitokondriális károsodásról számoltak be. Emellett az antioxidáns glutation (GSH) termelődését az oxLDL dózisfüggő módon indukálta.

A hiperkoleszterinémia által indukált oxidatív stresszről már számos tanulmány született. Az antioxidáns rendszerek kapacitását meghaladó mértékű gyökképződés irreverzibilisen károsítja a fehérjéket, lipideket és a DNS-t. Demenciás és hiperkoleszterinémiás betegek plazmájában nagy mennyiségű oxidált, illetve nitrált fehérje, valamint oxidált lipid található (Polidori és mtsai. 2004). Ez azt jelzi, hogy a szisztémás lipid/fehérje oxidáció a hiperkoleszterinémia és demencia (pl. Alzheimer-kór) közös tényezője. Populációs tanulmányok szerint az életszakasz közepén tapasztalt koleszterinszint emelkedés az Alzheimer-kór egy független kockázati tényezője (Kivipelto és mtsai. 2001). 70-90 év közötti egyéneknél, akiket Alzheimer-kórral diagnosztizáltak, a szérumkoleszterinszint már 15-25 évvel a betegség kialakulása előtt magas. Ez a magas koleszterinszint aztán számos patológiás folyamatot indukál az agyban, ami végül demencia kialakulásához (AD) vezet. Ezt a feltételezést támasztják alá azok a klinikai megfigyelések, melyek arról számolnak be, hogy a sztatinnal kezelt betegekben sokkal ritkábban alakul ki Alzheimer-kór (Mathew és mtsai. 2011). Beszámoltak már a sztatín kezelés neurofibrilláris köteggépződést csökkentő hatásáról is (Li és mtsai. 2007). Neurodegeneráció során a vér-agy gát is károsodik, átteresztővé válik. Azonban az nem teljesen egyértelmű, hogy ez az öregedés vagy betegségek következménye. SAMP-8 Tg egerekben, amelyek a „felgyorsított” öregedés modelljei, a vér-agy gát sérülése és az antioxidáns enzimek mennyiségének csökkenése mellett, a tanulási és memória funkciók károsodása mutatható ki (Pelegrini és mtsai. 2007, Surendra és mtsai. 2006).



Ezzel szemben az excitotoxicitás indukálta neurodegeneráció modelljében (kainsav okozta hippocampális excitotoxicitás) a vér-agy gát károsodása önmagában nem vezet neuronális apoptózishoz, csak peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) vér-agy gáton való átjutásával együtt. (Parathath 2006). Igazolták, hogy a peroxinitrit lipofil tulajdonságából adódóan képes átjutni a vér-agy gáton. A lipid-hidroperoxidok vér-agy gáton keresztüli átjutása mintegy nyolcszor nagyobb, mint a normál lipidek diffúzióval történő felvétele (Vila és mtsai. 2004). Tehát létezik egy direkt útvonal, amelyen keresztül a perifériás reaktív gyökök és lipidek agyba történő szállítása megvalósul. A plazma eredetű LDL-koleszterin nem képes átjutni a vér-agy gáton. LDLr hiányos egerek és nyulak azonban nem mutatnak semmiféle koleszterin szintézis zavart, illetve koleszterinszint változást az agyban (Yu és mtsai. 2004, Abbott és mtsai. 2002). A szérumkoleszterin-szint életszakasz közepén történő megemelkedése azonban Alzheimer-kór kialakulására hajlamosít (Dias és mtsai. 2014, Kivipelto és mtsai. 2001). Néhány tanulmány Alzheimer kóros betegek plazmájában és cerebrospinális folyadékában az oxiszteinek ( $24\text{OHC}$ ,  $27\text{OHC}$ ) mennyiségének csökkenését mutatta ki egészséges egyénekhez képest (Dias és mtsai. 2014). Az agyszövetben ezzel szemben megnövekedett mennyiségben vannak jelen. Emlősekből eddig a LXR-kat ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) azonosították, mint oxiszteinkötő nukleáris receptorokat, amelyek a test koleszterin-homeosztázisát szabályozzák (Wang 2002, Lajtha 2009). A LXR-ok aktivációja számos lipidmetabolizmusban fontos szerepet betöltő fehérje génjeit aktiválja (ABC transzporterek, ApoE, CETP, FAS, LPL, CYP7A1, SREBP-1c, ChREBP). A LXR-ok az Alzheimer-kór patogeneziséhez is hozzájárulnak az ABCA1, ApoE és az  $A\beta$  eltávolítás (clearance) közötti kapcsolaton keresztül. A LXR-ok inaktivációja az ApoE és az ABCA1 expressziójának csökkenéséhez vezet APP<sup>swe</sup> x PSEN1<sup>dE9</sup> tg egerekben, ezáltal fokozza az  $A\beta$  patológiát. Zelcer és mtsai. 2007). Az oxiszteinek koncentrációja perifériás gyulladás és oxidatív stressz esetén megemelkedik. Ekkor beépülnek az LDL-be, (oxLDL) és lerakódnak az erek falában vagy lipofil tulajdonságukból adódóan közvetlenül átjutnak a vér-agy gáton és hozzájárulnak az agyi gyulladásos folyamatokhoz és az amiloid plakkok kialakulásához. Egyelőre nem ismert, hogy a sztatin kezelés hatása valójában a koleszterinszint csökkentésében vagy inkább az oxLDL mennyiségének csökkentésében nyilvánul-e meg. További vizsgálatok szükségesek az oxiszteinek neurodegenerációt okozó hatásának igazolásához és egy lehetséges új terápiás stratégia kidolgozásához.

Munkánk során a hiperlipidémia neurodegenerációban betöltött szerepét vizsgáltuk. A terület a neurovaszkuláris szemlélet megszilárdulásával egyre inkább a figyelem fókuszába került. A neurovaszkuláris koncepció szerint a neurovaszkuláris egység károsodása valamint a

cerebrovaszkuláris rendszerben bekövetkező elváltozások hozzájárulnak a demencia kialakulásához és progressziójához. Vizsgálatainkhoz a hipertrigliceridemiás hApoB-100 transzgenikus egértörzset használtuk, amely a krónikusan magas szérumtriglicerid-szint következtében atherosclerotikus elváltozásokat mutat. Feltételezésünk szerint ezek az elváltozások nem kizárólag a kardiovaszkuláris rendszerre korlátozódnak, hanem a cerebrovaszkuláris rendszert is érintik. Az atherosclerosis által érintett agyi erekben hipoperfúzió, illetve szöveti ischemia alakul ki, aminek következtében fellépő oxidatív stressz vér-agy gát-károsodáshoz, és másodlagos neurodegeneratív folyamatok kialakulásához vezet. Munkánk során kísérletesen igazoltuk, hogy a krónikus hipertrigliceridémia az agyi lipidmetabolizmus megváltozásához, illetve neurofibrilláris degeneráció kialakulásához vezet. A vaszkuláris rendszerben bekövetkező elváltozások endothel diszfunkcióra vezethetőek vissza, amelynek elsődleges kiváltói az oxLDL-ben nagy mennyiségben jelenlevő oxisztaterek. Időszerű és helytálló mindezen mechanizmusok agyi kapilláris endothelsejteken történő tanulmányozása. Mindezen vizsgálatok elsősorban megfelelő modellrendszerek meglétét igénylik. Úgy véljük, hogy a hApoB-100 egértörzs vizsgálata nagyban hozzájárulhat a hiperlipidémia által okozott neurodegeneratív folyamatok megértéséhez.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Sántha Miklósnak a munkám során nyújtott szakmai irányításért. Hálás vagyok, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában dolgozhassak. Büszke vagyok az itt megszerzett szakmai tapasztalatokra, valamint köszönettel tartozom azért, hogy a kísérletek tervezéséhez és kivitelezéséhez nélkülözhetetlen önálló, logikus gondolkodást és problémamegoldást tanulhattam.

Ezúton szeretném megköszönni az Állatgenetikai és Molekuláris Neurobiológia csoport valamennyi jelenlegi - dr. Tóth Erzsébet Melinda, Csibrány Balázs, Hegyvári Ibolya, Nagy Dóra és Dukay Brigitta - és egykori munkatársának – dr. Bereczki Erika, Gonda Szilvia, Mari Mónika, Kasztner Anikó és Alföldi Róbert - a felém nyújtott baráti és szakmai támogatást, segítséget, valamint a jó munkához nélkülözhetetlen kellemes, baráti légkört.

Külön köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni dr. Deli Máriának és a Biológiai Barrierek Kutatócsoport valamennyi tagjának- Walter Fruzsina, Bocsik Alexandra, dr. Sántha Petra, dr. Veszeka Szilvia, dr. Kiss Lóránd, dr. Tóth Andrea és Harazin András - akik munkám során rengeteg szakmai és baráti segítséggel láttak el. Szakmai és emberi hozzáállásuk példaértékű számomra. Külön elismerésben szeretném részesíteni Walter Fruzsínát a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott szakmai és technikai segítségével, áldozatos és kitartó munkájáért.

Köszönettel tartozom prof. Penke Botondnak és munkatársainak, dr. Szegedi Viktornak és dr. Juhász Gábornak az elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzéséért, valamint Horváth Jánosnak és Furdán Szabinának a Golgi ezüstimpregnáció elvégzésében nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni az MTA SZBK Biokémia Intézet PhD felvételi bizottság tagjainak, hogy bizalmat szavaztak számomra és 2009-től megkaphattam az intézet PhD, majd 2012-ben pedig a fiatal kutatói ösztöndíját, amelynek keretében ez a munka elkészülhetett. Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni az MTA SZBK Biokémia Intézet valamennyi munkatársának a nap mint nap tapasztalt segítőkész és támogató hozzáállásért, a kialakult kellemes baráti légkörért.

Végül pedig kedves barátaimnak- Nagy Lajos István, dr. Faragó Nóra, dr. Ózsvári Béla- köszönöm, hogy erőt adtak, támogattak és bíztattak.

## Irodalomjegyzék

- Abbott N (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629–638.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1): 41-53.
- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S (1993). Modified hippocampal long-term potentiation in PKC $\gamma$ -mutant mice. *Cell* 75: 1253–1262.
- Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S (1993). PKC $\gamma$  mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75: 1263–1271.
- Abildayeva K, Berbée JF, Blokland A, Jansen PJ, Hoek FJ, Meijer O, Lütjohann D, Gautier T, Pillot T, De Vente J, Havekes LM, Ramaekers FC, Kuipers F, Rensen PC, Mulder M (2008). Human apolipoprotein C-I expression in mice impairs learning and memory functions. *J Lipid Res* 49(4): 856-869.
- Acharya NK, Levin EC, Clifford PM, Han M, Tourtellotte R, Chamberlain D, Pollaro M, Coretti NJ, Kosciuk MC, Nagele EP, Demarshall C, Freeman T, Shi Y, Guan C, Macphee CH, Wilensky RL, Nagele RG (2013). Diabetes and hypercholesterolemia increase blood-brain barrier permeability and brain amyloid deposition: beneficial effects of the LpPLA2 inhibitor darapladib. *J Alzheimers Dis* 35(1): 179-198.
- Adams SJ, Crook RJ, Deture M, Randle SJ, Innes AE, Yu XZ, Lin WL, Dugger BN, McBride M, Hutton M, Dickson DW, McGowan E (2009). Overexpression of wild-type murine tau results in progressive tauopathy and neurodegeneration. *Am J Pathol* 175(4): 1598-1609.
- Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M, Manfait M (2007). Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. *Biochim Biophys Acta* 1768(10): 2605-2615.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. (2010). Pericytes regulate the blood–brainbarrier. *Nature* 468, 557–561.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103(1): 26-35.
- Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, Hof PR (2004). The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 26, 573–578.
- Bartels AL, Kortekaas R, Bart J, Willemsen AT, de Klerk OL, de Vries JJ, van Oostrom JC, Leenders KL (2009). Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 30(11):1818-1824.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, Zlokovic BV (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.

- Berezki E, Bernát G, Csont T, Ferdinandy P, Scheich H, Sántha M (2008). Overexpression of human apolipoprotein B-100 induces severe neurodegeneration in transgenic mice. *J Promote Res* 7(6): 2246-2252.
- Bjelik A, Berezki E, Gonda S, Juhász A, Rimanóczy A, Zana M, Csont T, Pákási M, Boda K, Ferdinandy P, Dux L, Janka Z, Sántha M, Kálmán J (2006). Human apoB overexpression and a high-cholesterol diet differently modify the brain APP metabolism in the transgenic mouse model of atherosclerosis. *Neurochem Int* 49(4): 393-400.
- Björkham I., Meaney S (2004). Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(5): 806-815.
- Bookheimer SY, Strojwas MH, Cohen MS, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Mazziotta JC, Small GW (2000). Patterns of brain activation in people at risk for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 343(7):450-456.
- Bősze P. (szerk.) (2009). A magyar orvosi nyelv tankönyve. Budapest, Medicina Kiadó.
- Broadwell RD, Salzman M. (1981). Expanding the definition of the blood-brain barrier to protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7820-7824.
- Brown WR, Thore CR (2011). Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37, 56-74.
- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33(1): 95-130.
- Burgess BL, McIsaac SA, Naus KE, Chan JY, Tansley GH, Yang J, Miao F, Ross CJ, van Eck M, Hayden MR, van Nostrand W, St George-Hyslop P, Westaway D, Wellington CL (2006). Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A $\beta$  in plasma. *Neurobiol Dis* 24(1): 114-127.
- Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K (2003) Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar A $\beta$  in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res* 110(1): 119-125.
- Buttini M, Masliah E, Yu GQ, Palop JJ, Chang S, Bernardo A, Lin C, Wyss-Coray T, Huang Y, Mucke L (2010). Cellular source of apolipoprotein E4 determines neuronal susceptibility to excitotoxic injury in transgenic mice. *Am J Pathol* 177(2): 563-569.
- Callow MJ, Stoltzfus LJ, Lawn RM, Rubin EM (1994). Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein(a) in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6): 2130-2134.
- Caramelli P, Nitrini R, Maranhão R, Lourenço AC, Damasceno MC, Vinagre C, Caramelli B. (1999). Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 100(1): 61-63.
- Chang HC, Chen TG, Tai YT, Chen TL, Chiu WT, Chen RM (2011) Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked Lox-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(3):842-54.
- Chen ZL, Strickland S. (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91, 917-925.

- Cordonnier C. (2011). Brain microbleeds: more evidence, but still a clinical dilemma. *Curr Opin Neurol* 24, 69–74.
- Cromwell WC, Barringer TA (2009). Low-density lipoprotein and apolipoprotein-B: clinical use in patients with coronary heart disease. *Curr Cardiol Rep* 11(6): 468–475.
- Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, Csonka C, Puskás LG, Sántha M, Ferdinandy P (2007). Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 76(1):100-109.
- Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* 16(2): 209-221.
- Dias IH, Polidori MC, Griffiths HR (2014). Hypercholesterolaemia-induced oxidative stress at the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans* 42(4):1001-1005.
- Durrington PN (2007). *Hyperlipidaemia. Diagnosis and Management*. 3rd Edition. Boca Raton, Taylor & Francis Group
- Fang Y, Li J, Ding M, Xu X, Zhang J, Jiao P, Han P, Wang J, Yao S (2014). Ethanol extract of propolis protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury by inhibiting lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1-mediated oxidative stress. *Exp Biol Med* (Maywood) 2014 Jun 24. pii: 1535370214541911. [Epub ahead of print]
- Farese RV Jr, Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG (1995). Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(5): 1774-1778.
- Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149(5): 2628-2636.
- Farrall AJ, Wardlaw JM (2009). Blood–brain barrier: ageing and microvascular disease — systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 30, 337–352.
- Folin M, Baiguera S, Guidolin D, Di Liddo R, Grandi C, De Carlo E, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. (2005). Apolipoprotein-E modulates the cytotoxic effect of beta-amyloid on rat brain endothelium in an isoform-dependent specific manner. *Int J Mol Med* 17(5):821-826.
- Fowler SD, Greenspan P (1985). Application of Nile Red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: Comparison with Oil red O. *J Histochem Cytochem* 33(8): 833–836.
- Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, Capurso C, Santamato A, Sancarlo D, Vendemiale G, Pilotto A, Panza F (2010). Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer’s disease. *Ageing Res Rev* 9(4): 399–417.
- Gondré-Lewis MC, McGlynn R, Walkley SU (2003). Cholesterol accumulation in NPC1-deficient neurons is ganglioside dependent. *Curr Biol* 13(15): 1324-1329.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in

- mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(8): 5535-5544.
- Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, Fenart L (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* 1249:34-42.
- Götz J, Ittner LM (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 9(7): 532-544.
- Grammas P, (2011). Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 8, 26.
- Greenspan P, Mayer PE, Fowler SD (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100(3): 965-973.
- Hayashi H (2011). Lipid metabolism and glial lipoproteins in central nervous system. *Biol Pharm Bull* 34(4): 453-461.
- Homanics GE, Smith TJ, Zhang SH, Lee D, Young SG, Maeda N (1993). Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6): 2389-2993.
- Hort MA, Stralioetto MR, de Oliveira J, Amoêdo ND, da Rocha JB, Galina A, Ribeiro-do-Valle RM, de Bem AF (2014). Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. *Biochimie* 105:172-181.
- Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, Sugiura Y, Ugawa Y (2011). Chemical preconditioning-induced reactive astrogliosis contributes to the reduction of post-ischemic edema through aquaporin-4 downregulation. *Exp Neurol* 227, 89-95.
- Huang Y (2011). Roles of apolipoprotein E4 (ApoE4) in the pathogenesis of Alzheimer's disease: lessons from ApoE mouse models. *Biochem Soc Trans* 39(4): 924-932.
- Iadecola C (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Rev Neurosci*. 5, 347-360.
- JE (2004). The metabolic syndrome and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59(2): 139-142.
- Jellinger KA (2005). Understanding the pathology of vascular cognitive impairment. *J Neurol Sci* 229-230: 57-63.
- Jellinger KA (2007). The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol*. 113(4): 349-388.
- Jellinger KA. (2010). Prevalence and impact of cerebrovascular lesions in Alzheimer and lewy body diseases. *Neurodegener Dis* 7, 112-115.
- Jiwa NS, Garrard P, Hainsworth AH (2010). Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. *J Neurochem* 115(4): 814-828.
- Kalaria RN (2010). Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutr Rev* 68, S74-S84.
- Kalayci R, Kaya M, Uzun H, Bilgic B, Ahishali B, Arican N, Elmas I, Küçük M (2009). Influence of hypercholesterolemia and hypertension on the integrity of the blood-brain barrier in rats. *Int J Neurosci* 119(10): 1881-1904.

- Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T (1996). Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 7(4): 177-181.
- Kivipelto M, Helkala E, Laakso M, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451
- Koch S, Donarski N, Goetze K, Kreckel M, Stuerenburg HJ, Buhmann C, Beisiegel U (2001). Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *J Lipid Res* 42(7): 1143-1151.
- Kramer MA (2005). *Trends in Cholesterol Research*. Nova Science Publishers Inc.
- Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE (1998). Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252(3): 711-715.
- Kuschinsky W, Paulson OB (1992). Capillary circulation in the brain. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev* 4, 261–286.
- LaDu MJ, Reardon C, Van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, Getz GS (2000). Lipoproteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 903: 167-175.
- Lajtha A, Tettamanti G, Goracci G. (2009). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* 3rd edition, Neural Lipids, Springer Science and Business Media, LLC.
- Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, Linton MF, Fazio S, LaDu MJ, Li L (2010). Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285(47): 36958-36968.
- Li G, Larson EB, Sonnen JA, Shofer JB, Petrie EC, Schantz A, Peskind E R, Raskind MA, Breitner JC, Montine TJ (2007). Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* 69, 878–885.
- Li W, Ghosh M, Eftekhari S, Yuan XM (2011). Lipid accumulation and lysosomal pathways contribute to dysfunction and apoptosis of human endothelial cells caused by 7-oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun* 409(4):711-716.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2002). Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. *FEBS Lett* 530(1-3): 209-214.
- Löffler T, Flunkert S, Havas D, Sántha M, Hutter-Paier B, Steyrer E, Windisch M (2013). Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. *Neurobiol Aging* 34(10):2379-2388.
- Ludányi Zs. (2007). A külön- és egybeírás kérdései a magyar orvosi nyelvben. *Magyar Orvosi Nyelv* 1. 27–33.
- Ludányi Zs. (2008). Orvosi helyesírás - mit tükröz az írásgyakorlat? *Magyar Orvosi Nyelv* 1. 6-13.
- Ludányi Zs. (2009). Az idegenes és a magyaros helyesírás kérdése a magyar orvosi nyelvben. In: Kuna Ágnes - Veszelszki Ágnes szerk. Félúton 3. A harmadik Félúton konferencia (2007) kiadványa. ELTE BTK Nyelvtudományi Doktori Iskola, Budapest. 162–180.



- Luo Y, He Q, Kuang G, Jiang Q, Yang J (2014). PPAR-alpha and PPAR-beta expression changes in the hippocampus of rats undergoing global cerebral ischemia/reperfusion due to PPAR-gamma status. *Behav Brain Funct* 10(1): 21.
- Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41(2): 195-198.
- Marques F, Sousa JC, Sousa N, Palha JA (2013). Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 8: 38.
- Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111(6): 1275-1308.
- Mathew A, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2011). Alzheimer's disease: Cholesterol a menace? *Brain Res Bull* 86(1-2): 1-12
- McCormick SP, Ng JK, Véniant M, Borén J, Pierotti V, Flynn LM, Grass DS, Connolly A, Young SG (1996) Transgenic mice that overexpress mouse apolipoprotein B. Evidence that the DNA sequences controlling intestinal expression of the apolipoprotein B gene are distant from the structural gene. *J Biol Chem* 271(20):11963-11970.
- Mhatre M, Nguyen A, Kashani S, Pham T, Adesina A, Grammas P (2004). Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment. *Neurobiol Aging* 25, 783–793.
- Moellering DR, Levonen AL, Go YM, Patel RP, Dickinson DA, Forman HJ, Darley-Usmar VM (2002). Induction of glutathione synthesis by oxidized low-density lipoprotein and 1-palmitoyl-2-arachidonyl phosphatidylcholine: protection against quinone-mediated oxidative stress. *Biochem J* 362(Pt 1):51-59.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54(3-4): 253-263.
- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Kataoka Y, Niwa M (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 27, 687–694.
- Napoli C, Palinski W (2005). Neurodegenerative diseases: insights into pathogenic mechanisms from atherosclerosis. *Neurobiol Aging* 26(3): 293-302.
- Ogura S, Kakino A, Sato Y, Fujita Y, Iwamoto S, Otsui K, Yoshimoto R, Sawamura T (2009). Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction. *Circ J* 73(11):1993-1999.
- Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, Capurso A, Solfrizzi V (2006). Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 51(2): 275–292.
- Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE (2006). Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 119(2):339-349.

- Pardridge WM (2002). Blood-Brain Barrier Drug Targeting Enables Neuroprotection in Brain Ischemia Following Delayed Intravenous Administration of Neurotrophins. In: Alzheimer C (ed.) Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS. Kluwer Academic/Plenum Publishers - Landes Bioscience, New York - Georgetown (Advances in Experimental Medicine and Biology Vol 513), 397-430.
- Paula-Lima CA, Tricceri MA, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Oliveira FF, Magdesian MH, Grinberg LT, Panizzutti R, Ferreira ST (2009). Human apolipoprotein A-I binds amyloid- $\beta$  and prevents A $\beta$ -induced neurotoxicity. *Biochem Cell Biol* 41(6): 1361-1370.
- Pelech S, Sutter C, Zhang H (2003). Kinetworks protein kinase multiblot analysis. *Methods Mol Biol* 218:99-111.
- Pelegri C, Canudas, AM, del Valle J, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallas M, Vilaplana J (2007). Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech Ageing Dev* 128, 522-528.
- Polidori MC, Mattioli P, Aldred S, Cecchetti R, Stahl W, Griffiths H, Senin U, Sies H, Mecocci P (2004). Plasma antioxidant status, immunoglobulin G oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 18, 265-270.
- Puglielli L, Tanz RE, Kovacs DM (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6(4): 345-351.
- Ramírez C, Sierra S, Tercero I, Vázquez JA, Pineda A, Manrique T, Burgos JS (2011). ApoB100/LDLR-/- hypercholesterolaemic mice as a model for mild cognitive impairment and neuronal damage. *PLoS One* 6(7):e22712.
- Ranall MV, Gabrielli BG, Gonda TJ (2011). High-content imaging of neutral lipid droplets with 1,6-diphenylhexatriene. *Biotechniques* 51(1): 35-36, 38-42.
- Raygani VA., Rahimi Z, Kharazi H, Tavilani H, Pourmotabbed T (2006). Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid apolipoprotein levels with Alzheimer's disease. *Neu Let* 408(1): 68-72.
- Reitz C, Luchsinger J, Tang MX, Manly J, Mayeux R (2005). Impact of plasma lipids and time on memory performance in healthy elderly without dementia. *Neurology* 64(8): 1378-1383.
- Rosenberg GA (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 8, 205-216.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T (2006). *APP* locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genet* 38, 24-26.
- Sabbagh M, Zahiri HR, Ceimo J, Cooper K, Gaul W, Connor D, Sparks DL (2004). Is there a characteristic lipid profile in Alzheimer's disease? *J Alzheimer's Dis* 6(6): 585-589.
- Saito N, Shirai Y (2002). Protein kinase C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ): function of neuron specific isotype. *J Biochem* 132: 683-687.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005). Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035(1): 24-31.

- Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13(4): 455-459.
- Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 6, 258–268.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH (2002). Gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3(4):281-90.
- Skinner ER (2002). *Brain Lipids and Disorders in Biological Psychiatry*. Amsterdam, Elsevier Science B.V.
- Smith CD, Andersen AH, Kryscio RJ, Schmitt FA, Kindy MS, Blonder LX, Avison MJ (1999). Altered brain activation in cognitively intact individuals at high risk for Alzheimer's disease. *Neurology*. 53(7):1391-1396.
- Steffen Y, Wiswedel I, Peter D, Schewe T, Sies H (2006). Cytotoxicity of myeloperoxidase/nitrite-oxidized low-density lipoprotein toward endothelial cells is due to a high 7beta-hydroxycholesterol to 7-ketocholesterol ratio. *Free Radic Biol Med* 41(7):1139-1150.
- Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y, Takuwa Y, Kakino A, Fujita Y, Tanaka T, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y (2009). LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 84(1):127-36.
- Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallas M (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* 41, 360–367.
- Süle Z, Mracskó E, Bereczki E, Sántha M., Csont T, Ferdinandy P, Bari F, Farkas E (2009). Capillary injury in the ischemic brain of hyperlipidemic, apolipoprotein B-100 transgenic mice. *Life Sci* 84(25-26): 935–939.
- Takechi R, Galloway S, Pallegage-Gamarallage MM, Wellington CL, Johnsen RD, Dhaliwal SS, Mamo JC (2010). Differential effects of dietary fatty acids on the cerebral distribution of plasma-derived apo B lipoproteins with amyloid-beta. *Br J Nutr* 103(5): 652-662.
- Thambisetty M., Beason-Held L, An Y, Kraut MA, Resnick SM (2010) APOE ε4 genotype and longitudinal changes in cerebral blood flow in normal aging. *Arch Neurol* 67, 93–98.
- Tontsch U, Bauer HC (1989). Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. *Microvasc Res* 37(2): 148-161.
- Vance JE, Hayashi H, Karten B (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16(2): 193-212.
- Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, Bu G, Frieden C, Holtzman DM (2013). ApoE influences amyloid-β (Aβ) clearance despite minimal apoE/Aβ association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(19): 1807-1816.

- Vila A, Levchenko VV, Korytowski W, Girotti AW (2004). Sterol carrier protein-2-facilitated intermembrane transfer of cholesterol- and phospholipid-derived hydroperoxides. *Biochemistry* 43(39):12592-605.
- Wang H, Eckel RH (2014). What are lipoproteins doing in the brain? *Trends Endocrinol Metab* 25(1): 8-14.
- Wang L, Schuster GU, Hultenby K, Zhang Q, Andersson S, Gustafsson JA (2002). Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):13878-13883.
- Watanabe T, Koba S, Kawamura M, Itokawa M, Idei T, Nakagawa Y, Iguchi T, Katagiri T (2004). Small dense low-density lipoprotein and carotid atherosclerosis in relation to vascular dementia. *Metabolism* 53(4): 476–482.
- Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, Brooks AI, Kanagala S, Rubio A, Sagare A, Liu D, Li F, Armstrong D, Gasiewicz T, Zidovetzki R, Song X, Hofman F, Zlokovic BV (2005). Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med* 11(9):959-965.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29(3): 422-437.
- Yu C, Youmans KL, LaDu MJ (2010). Proposed mechanism for lipoprotein remodelling in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1801(8): 819-823.
- Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC (2004). Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res* 45, 301–307.
- Zelcer N, Khanlou N, Clare R, Jiang Q, Reed-Geaghan EG, Landreth GE, Vinters HV, Tontonoz P. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(25):10601-10606.
- Zhong Z, Ilieva H, Hallagan L, Bell R, Singh I, Paquette N, Thiagarajan M, Deane R, Fernandez JA, Lane S, Zlokovic AB, Liu T, Griffin JH, Chow N, Castellino FJ, Stojanovic K, Cleveland DW, Zlokovic BV (2009). Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells. *J Clin Invest* 119, 3437–3449.
- Zlokovic BV (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28, 202-208.
- Zlokovic BV (2008). New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5(3):409-414.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57(2): 178-201.
- Zlokovic BV (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 12(12): 723-738.

## Saját publikációk

Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, Kasztner A, Horváth J, Bereczki E, Tóth ME, Penke B, Sántha M: **Increased Tau Phosphorylation and Impaired Presynaptic Function in Hypertriglyceridemic ApoB-100 Transgenic Mice** PLOS ONE 7:(9) Paper e46007. 12 p. (2012)

IF: 3.730

Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E, Csibrány B, Alföldi R, Lénárt N, Penke B, Sántha M: **Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice** CELL STRESS & CHAPERONES 18:(6) pp. 759-771. (2013)

IF: 2.537

Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, Sántha M, Molnár M, Tuka B, Vécsei L, Marton A, Vizler Cs, Oláh M, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E: **Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic like behavior with a cannabinoid receptor independent manner via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors** Neuropharmacology 89, 298-307. (2015)

Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Török Z, Pilbat AM, Puskás LG, Sántha M, Deli MA: **Effect of ApoB100 overexpression in cultured cells of the neurovascular unit**  
manuscript in preparation

Dénes Á, Coutts G, Lénárt N, Pelegrin P, Skinner J, Rothwell N, Allan MS, Brough D: **AIM2, NLRC4 and ASC inflammasomes contribute to acute brain injury**  
manuscript in preparation

## Összefoglaló

Az utóbbi évtizedekben számos olyan klinikai tanulmány született, amely a hiperlipidémia (elsősorban a hiperkoleszterinémia) és az időskori kognitív károsodással járó kórképek (demenciák) közötti összefüggés megértését célozta. A neurovaszkuláris szemlélet kialakulásával a demenciák patomechanizmusának vaszkuláris aspektusára helyeződött a hangsúly, ezáltal a hiperlipidémia okozta cerebrovaszkuláris elváltozások vizsgálata is előtérbe került. Az időskori demencia és kognitív hanyatlás gyakran vaszkuláris eredetű és az esetek többségében diszlipidémiával és atherosclerosissal jár. A betegség hátterében stroke, trauma, agyvelőgyulladás, magas vérnyomás, cukorbetegség, elhízás vagy magas koleszterinszint áll. A magas szérum-LDL-koleszterinszint érlelmeszesedéshez, hosszú távon pedig szívelégtelenséghez vezet. A VLDL és LDL molekulák fő apoprotein komponense az ApoB-100.

Munkánk során a hiperlipidémia és a neurodegeneráció közötti kapcsolatot vizsgáltuk a humán ApoB-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek segítségével. Ez az egértörzs lipidekben gazdag diétán tarva az atherosclerosis egyik validált modellje. Korábban csoportunk is előállította ezt a törzset, és kimutatta, hogy a transzgenikus egerek normál tápon tartva magas szérumtriglicerid-szinttel, koleszterindús tápon tartva magas szérumkoleszterinszinttel rendelkeznek, ami megnövekedett oxidatív stresszhez, és lipidperoxidáció kialakulásához vezet, továbbá az állatok agykérgében a membrán-kötött APP mennyisége jelentősen megnő. Normál tápon tartott transzgenikus egerekre hipertrigliceridémia, kiterjedt kortikális neuronális apoptózis, és ennek következtében az agykamrák nagymértékű tágulata jellemző. Indukált ischemiás körülmények között az agyi mikroerek denzitásának jelentős csökkenése, illetve ezt kompenzálóan a kapillárisok átmérőjének növekedése tapasztalható.

Mindezen kísérleti előzményekből kiindulva a hipertrigliceridémia agyi lipidmetabolizmusra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy transzgenikus egerek agykérgében az ApoE és LDLr mennyisége szignifikánsan magasabb, míg az ApoA-I mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a vad típusú állatokéhoz képest. Az ApoE és az LDLr mennyiségének növekedése fokozott celluláris koleszterin és foszfolipid metabolizmusra utal. Az ApoA-I mennyiségének redukcója a cerebrális erekben hozzájárulhat a gyulladás, illetve a ROS endothel károsító hatásának csökkent tolerálásához. A magas trigliceridszint az agyban trigliceridtartalmú lipidcseppek kialakulásához vezet, míg a szabad koleszterin mennyisége nem mutat változást. Jóllehet, a kortikális APP mennyiségének növekedését mutattuk ki,

amiloid plakk képződést a heterozigóta transzgenikus állatok agyszövetében nem tudtunk kimutatni. Ez részben az ApoE megnövekedett mennyiségével magyarázható, ami aktívan részt vesz az A $\beta$  peptid folyamatos eltávolításában. Kimutattuk továbbá, hogy transzgenikus egerek agyában a Tau-fehérje már fiatal korban több oldalláncán is hiperfoszforilálódik (TaupSer<sup>262, 199/202, 396, 404</sup>), ami a mikrotubulus-hálózat dezorganizációjához, szövettanilag neurofibrilláris kötegek (TaupSer<sup>404</sup>) megjelenéséhez, az axonális transzportfolyamatok és a szinaptikus transzmisszió károsodásához, végül pedig a neuronok elhalásához vezet. Mindezek a neurodegeneratív elváltozások dendrittüske-sűrűség csökkenésben, valamint kiterjedt kortikális és hippocampális apoptózisban nyilvánulnak meg. A tapasztalt morfológiai elváltozások funkcionális következményeit vizsgálva már fiatal korban a rövidtávú szinaptikus plaszticitás károsodását (csökkent PPF arányokat) és egyidejűleg a PKC- $\gamma$  fehérje mennyiségének markáns csökkenését mutattuk ki. A tapasztalt funkcionális és morfológiai elváltozások arra sarkalltak minket, hogy megvizsgáljuk a vér-agy gát hiperlipidémia általi érintettségét is. Azt tapasztaltuk, hogy a transzgenikus állatokban a vér-agy gát kis molekulákra, ugyan nem szignifikánsan, de átjárhatóbbá válik. Ezt a hatást a lipid diéta azonban tovább nem fokozta. Nagy mólsúlyú anyagokra való átjárhatóság tekintetében a lipid diéta szinte minden agyterületen fokozta a transzcelluláris permeabilitást. A Tg állatokból izolált mikroerek génexpressziós mintázatát vizsgálva feltűnő volt a magas LOX1 és ApoB expresszió. Kimutattuk, hogy az ApoB-100 az agyi kapilláris endothelsejtekben, valamint a pericytákban és astrocytákban is expresszálódik. A fehérje megnövekedett mennyisége a transzgenikus állatok agykérgében western blottal is kimutatható. Megtalálható ezen kívül az agyi kapillárisok és venulák falában, illetve ezek környezetében is. Immuncitokémiás vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az ApoB-100 fehérje a vad típusú állatok vér-agy gát sejtjeiben is kimutatható. Ez újdonságnak számít, a szakirodalomban eddig nem volt ismert, szerepét azonban nem ismerjük. A periférián betöltött funkciójából adódóan valószínűleg a sejtek jobb lipid hasznosítását segíti elő. Mindezt ApoB immunreaktivitást mutató primer kapilláris endothelsejtek és astrocyták növekedési kinetikájának vizsgálata során is megfigyeltük, a transzgenikus állatokból származó sejtek szignifikánsan gyorsabban nőttek a vad típusú sejtekhez képest. A LOX1 megnövekedett mennyisége a mikroerekben fokozott cerebrovaszkuláris lipidperoxidációra és oxidatív károsodásra utal. Ennek nyomán a primer sejtek oxLDL-lel szembeni érzékenységét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az egyes sejtípusok érzékenysége eltérő. Legérzékenyebbnek az astrocyták és endothelsejtek, legkevésbé érzékenynek pedig a pericyták bizonyultak. Valamennyi sejtípuson az oxLDL dózisfüggő viabilitás csökkentő hatását figyeltük meg. A viabilitás csökkenést minden

esetben LDH teszttel igazoltuk. Azt tapasztaltuk, hogy vad típusú astrocyták és endothelsejtek szignifikánsan nagyobb membránkárosodást és viabilitás csökkenést mutatnak az oxLDL hatására, mint a transzgenikus sejtek. Ezzel szemben a pericyták minimális viabilitás csökkenést és erőteljes membránkárosodást mutatnak. A jelenség megértését célozva megmértük a sejtek ROS termelését oxLDL kezelés hatására. Azt találtuk, hogy transzgenikus endothelsejtekben és pericytákban a bazális ROS termelődés szignifikánsan nagyobb a vad típushoz képest, amit az oxLDL kezelés transzgenikus sejtekben csak tovább fokoz. Astrocytáknál fordított a helyzet: a vad típusú sejtekben nagyobb a ROS termelődés a transzgenikus sejtekhez képest. Mindezen megfigyeléseink az irodalmi adatokkal megegyezők, azonban további vizsgálatok szükségesek az oxLDL által kiváltott endothel diszfunkció mechanizmusának pontos megértéséhez.

Hipotézisünk szerint a tartós hiperlipidémia hApoB-100 transzgenikus egerek cerebrovaszkuláris rendszerében érkárosodásokat indukál. Az ennek következtében fellépő agyi hipoperfúzió és magas szérumlipid-szint oxidatív stresszhez és gyulladásához vezet. Az oxidált lipidek, főként az oxiszteinek, endothel diszfunkciót és vér-agy gát-károsodást okoznak. A vér-agy gát károsodása és a szöveti ischemia neurodegeneratív folyamatokat indukál az agyban. Eredményeink azt mutatják, hogy a hApoB-100 egértörzs a hiperlipidémia okozta neurofibrilláris degeneráció modellezésére alkalmas, azonban további vizsgálatok szükségesek az oxidált lipidek patogenezisben betöltött szerepének tisztázásához.



## Summary

In the last few decades several clinical studies aimed to understand the connection between hyperlipidemia (mainly hypercholesterolemia) and age-related cognitive disorders (dementia). In the new neurovascular concept, emphasis was laid on the vascular aspect in the pathomechanism of dementias, therefore investigations on the cerebrovascular alterations came to the front. Cognitive decline is frequently accompanied by dyslipidemia and atherosclerosis in elderly people. The underlying mechanisms of vascular dementia are high LDL-cholesterol level, stroke, trauma, encephalitis, hypertonia, diabetes, and obesity. The high level of low density lipoproteins (LDL) leads to the development of atherosclerosis and cardiac failure. ApoB-100 is the major protein component of VLDL and LDL particles. Recent reports pointed out that hyperlipidemia and atherosclerosis are not only implicated in the pathogenesis of cardiovascular diseases, but they also affect the cerebrovascular system and contribute to the development of neurodegenerative disorders.

We have been investigating the possible link between hyperlipidemia and neurodegeneration in human ApoB-100 transgenic mice, which strain fed on cholesterol-rich diet is a validated model of atherosclerosis. Previously, this mouse strain was created and characterized in our laboratory. We have shown that upon normal diet these mice were hypertriglyceridemic, while on cholesterol-rich diet they had elevated serum cholesterol level, which led to increased oxidative stress and lipid peroxidation. We have also found an increase in the level of membrane-bound APP in the cortex of transgenics. Transgenic mice fed on normal chow have high triglyceride level and they show extensive cortical and hippocampal apoptosis, neurodegeneration eventually leading to the enlargement of the brain ventricles. Under ischemic conditions the density of the cortical capillary network was significantly reduced and as a compensatory mechanism, the diameter of the capillaries were increased.

First, the effect of hypertriglyceridemia on cerebral lipid metabolism was investigated. We found that the cerebral level of ApoE and LDLr was increased, whereas the cerebral level of ApoA-I was decreased in transgenic mice compared to wild type littermates. The high amount of ApoE and LDLr possibly refers to increased cellular cholesterol metabolism, while the reduction of ApoA-I can contribute to reduced tolerance in inflammation and oxidative stress caused by ROS on brain capillary endothelial cells. The high level of serum triglycerides led to the formation of intracellular lipid droplets in the brain parenchyma of transgenic animals. Although, we found that the amount of cortical APP was increased, no amyloid

plaques were detected in the brain tissue of heterozygous transgenic animals. This can be the consequence of the elevated ApoE level, which is responsible for facilitating the clearance of A $\beta$  peptide.

We have also demonstrated that the Tau protein is hyperphosphorylated at several sites (TauSer<sup>262, 199/202, 396, 404</sup>) in the cortex of transgenic animals compared to wild type, which histologically leads to the formation of neurofibrillary tangles (TauSer<sup>404</sup>). The hyperphosphorylation of Tau disorganizes the microtubule network, impairs the axonal transport, synaptic transmission and eventually leads to neuronal cell death. These neurodegenerative changes manifest in extensive dendritic spine-density reduction, cortical and hippocampal apoptosis of neuronal cells. In parallel with these morphological changes we revealed impaired learning, memory (decreased LTP amplitude), and short-term synaptic plasticity (reduced PPF ratios) and simultaneously pronounced reduction in PKC- $\gamma$  protein level.

Due to the evident morphological and functional alterations detected in Tg mice we raised the question how chronic hyperlipidemia might affect permeability of the blood-brain barrier. We found, that hyperlipidemia notably, but not significantly, increased the paracellular permeability of the blood-brain barrier in transgenic mice. The genotype itself did not influence the function of the blood-brain barrier severely, but in combination with hyperlipidemia the paracellular permeability was significantly increased in transgenic brains. We have also observed that lipid diet had pronounced effect on transcellular permeability, as it significantly increased vascular permeability for large molecules in all investigated brain area in both transgenic and wild type animals.

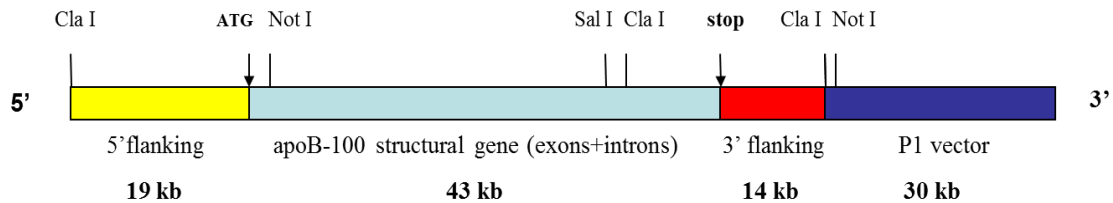
We found a high expression level of the ApoB-100 and LOX1 in isolated cortical microcapillaries and detected strong ApoB immunoreactivity in primary endothelial cells, pericytes and astrocytes derived from transgenic animals. Löffler et al. have shown perivascular accumulation of ApoB in the brain of transgenic mice referring to vascular lesions and blood-brain barrier damage. However, further investigations are needed to reveal the harmful effect of the accumulated ApoB protein in the brain. Using immunostaining we showed the presence of ApoB-100 protein in wild type endothelial cells, astrocytes and pericytes. This was a novel observation and was not published earlier. Under normal physiological conditions ApoB-100 presumably helps in better utilization of lipids on the cellular level. Similar effect was observed during cultivation of primary capillary endothelial cells and astrocytes. Cells originated from transgenic animals grew significantly better and faster compared to wild type cells using the same cultivation conditions. The elevated

expression level of LOX1 in the microvessels may refer to increased oxidative damage and cerebrovascular lipid peroxidation. In connection with this finding we monitored the sensitivity of primary cells subjected to oxLDL treatment. We have shown that primary cell types have different vulnerability to oxLDL. A dose-dependent reduction in cell viability was noticed in all oxLDL treated cell types. Astrocytes and endothelial cells were the most, and pericytes the less sensitive to the treatment. The viability results were confirmed by LDH test. We observed that wild type astrocytes and endothelial cells show significantly higher degree of membrane damage and reduction in viability than transgenic cells. In contrast, pericytes were less vulnerable, they showed a mild decrease in viability and strong membrane impairment. To elucidate the reason for this phenomenon we measured the ROS production of the cells during oxLDL treatment. We found that in transgenic endothelial cells and pericytes the basic ROS production is significantly higher than in wild type cells, which is further enhanced by the oxLDL treatment in transgenic cells. Regarding astrocytes the opposite was true: wild type cells produced significantly more ROS than transgenic cells. Each of our results are consistent with data found in the literature, but further investigations are needed to elucidate the exact mechanism of endothelial dysfunction caused by oxLDL.

Our hypothesis was that the cerebrovascular system was strongly affected by chronic hyperlipidemia in hApoB-100 transgenic mice. As a consequence of hyperlipidemia atherosclerotic lesions were developed in the cerebrovascular system, which led to brain hypoperfusion, oxidative stress and inflammation. The oxidized lipids, especially oxysterols initiated endothelial dysfunction and disruption of the blood-brain barrier. The damage of the blood-brain barrier and the existing cerebral ischemia induced neurodegenerative processes in the brain. Our results showed that the hApoB-100 mouse strain is a versatile model to study hyperlipidemia induced neurofibrillary degeneration.

## Függelék

### 1. A humán apob-100 P1 (fagemid) transzgén fizikai térképe (106kb)

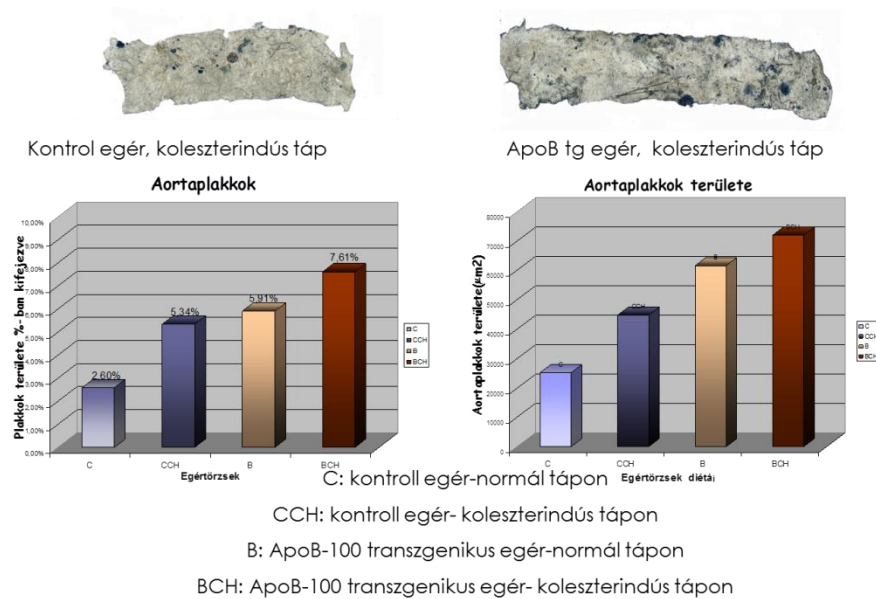


A konstrukciót előállította: Dr. Matthew Callow, Lawrence Berkley, National Laboratory

### 2. A humán ApoB-100 fehérje expressziója Wt és Tg egerek szerveiben.



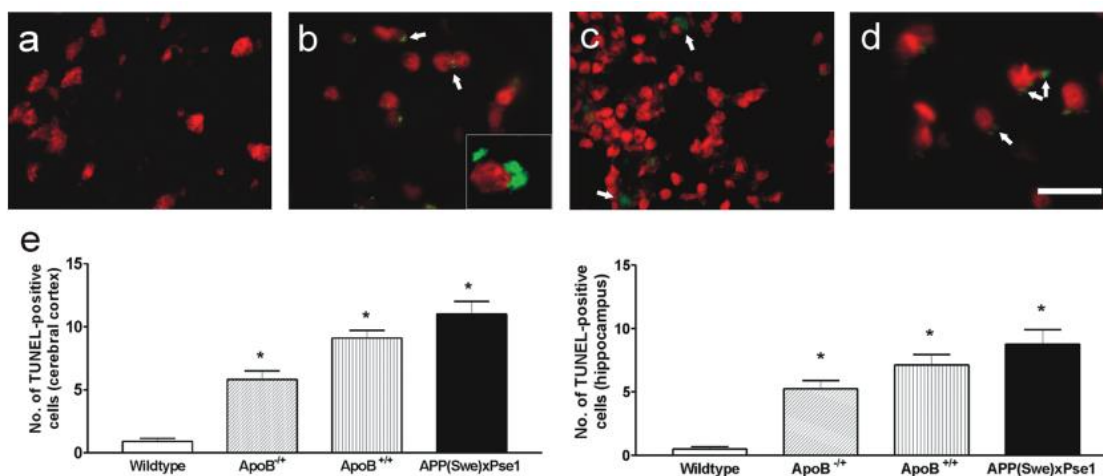
### 3. Aorta atheroma festés (Sudan IV) és a plakkok méretének (az aorta teljes méretének%-ban) meghatározása koleszterin-dús és normál tápon tartott Wt és Tg egerekben.



#### 4. RT-PCR primer szekvenciák

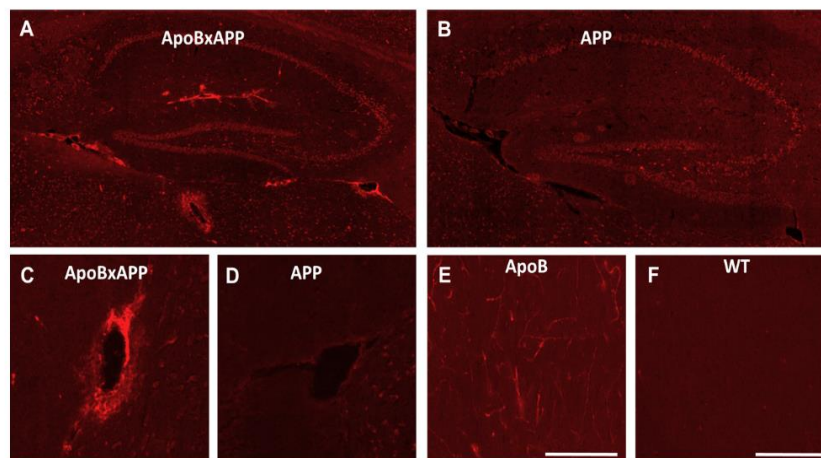
<i>Gén neve</i>	<i>forward szekvencia</i>	<i>reverse szekvencia</i>
Cldn5	ACGGGAGGAGCGCTTTAC	GTTGGCGAACCAGCAGAG
Ocln	CACGACAGGTGGGGAGTC	TTGATCTGAAGTGATAGGTGGATATT
ZO1(Tjp1)	CGCGGAGAGAGACAAGATGT	AGCGTCACTGTGTGCTGTTC
ApoE	GACCCTGGAGGCTAAGGACT	AGAGCCTTCATCTTCGCAAT
ApoB	TTTAAAGGACTTTGGGACTGGC	AAGCTGCCTCTTCTTCCCAAT
LDLr	CAAGAGGCAGGGTCCAGA	CCAATCTGTCCAGTACATGAAGC
Olr1 (LOX1)	CCTGCTGCTATGACTCTGGTC	GAGGTCAGATACCTGGCGTAA
SCARB1 (SRB1)	GCCCATCATCTGCCAACT	TCCTGGGAGCCCTTTTTACT
PPAR- $\gamma$	AAGACAACGGACAAATCACCA	GGGGGTGATATGTTTGAACCTG
RXR- $\alpha$ (Nr2b1)	ACATGCAGATGGACAAGACG	GGGTTTGAGAGCCCCTTAGA
LXR- $\beta$ (Nr1h2)	AGCTCTGCCTACATCGTGGT	TCATGGCCCAGCATCTTC
APP	TACTGCATGGCGGTGTGT	CGTGGAAGTTTATCAGGATCT
LRP1	ATTGAGGGCAAGATGACACA	CCAGTCTGTCCAGTACATCCAC
LRP2	GATGGATTAGCCGTGGACTG	TCCGTTGACTCTTAGCATCTGA
RAGE	ACTACCGAGTCCGAGTCTACC	CCCACCTTATTAGGGACACTGG
Glut1 (Slc2a1)	GGATCCCAGCAGCAAGAAG	CCAGTGTTATAGCCGAACTGC
MRP1 (ABCC)	GACCGGGGCTACATCCAGAT	TGTTGGGCTGACCAGTAACAC
P-gp (ABCB1B)	GGGCATTTACTTCAAACCTGTCA	TTTACAAGCTTCATTTCTTAATTCAA
Cav-1	GCGACCCCAAGCATCTCAA	ATGCCGTCGAAACTGTGTGT
ApoA-I	TATGTGGATGCGGTCAAAGA	TGAACCCAGAGTGTCCCAGT
MEOX2 (MOX2)	AATCTAGACCTCACTGAAAGACAGG	CTTTGACCCGCTTCCACTT
eNOS		
iNOS		
GAPDH	GGGTTCTTATAAATACGGACTGC	CCATTTTGTCTACGGGACGA
ACTB	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA

#### 5. Apoptótikus sejtek kimutatása TUNEL Assay-vel (Berezki és mtsai. 2008.)



Apoptótikus sejtek (fehér nyilak) kimutatása (átlag $\pm$ SEM) TUNEL assay-vel Wt (a), APP<sup>swe</sup> x PSEN1dE9 (b) és ApoB tg (c, d) egerek agykérgében és hippocampusában (400x nagyítás, mérce: 25 $\mu$ m). \* Tg szignifikáns a Wt-hoz képest ( $p < 0,05$ , statisztikai próba: egyszempontos ANOVA, Bonferroni poszt-hoc teszt)

6. Az ApoB fehérje perivaszkuláris lokalizációjának kimutatása az agykéreg és a hippocampus területén. Löffler et al. 2013.



7. A humán LDL- és ApoB-szintek:

cardiovaszkuláris betegség kialakulásának kockázata	szérum-LDL-szint	étékhatar	szérum-ApoB-szint
0-20%	<1mg/ml	optimális	<0,9mg/ml
20-50%	1-1,3mg/ml	optimum közeli	0,9-1,17mg/ml
50-80%	1,3-1,6 mg/ml	határérték	1,14-1,44mg/ml
89-95%	1,6-1,9mg/ml	magas	1,44-1,71mg/ml
>95%	>1,9mg/ml	nagyon magas	>1,71mg/ml

Primer sejtek kezelése során alkalmazott oxLDL koncentrációk:

	koncentráció (ug/ml)	ApoB koncentráció (ug/ml)
<b>oxLDL</b>	50	45
	100	90
	150	135
	200	180
<b>LDL</b>	200	180